

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
( **Н И У « Б е л Г У »** )

**ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК**

**Кафедра биотехнологии и микробиологии**

**ВЛИЯНИЕ НАНОКАПСУЛИРОВАННЫХ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ  
РАСТЕНИЙ НА РОСТ *CANDIDA ALBICANS* В КУЛЬТУРЕ**

**Магистерская диссертация**

Студента очной формы обучения

направления подготовки 06.04.01 Биология

магистерская программа Микробиология

2 года обучения группы 07001643

Анпиловой Анны Эдуардовны

**Научный руководитель**

старший преподаватель

кафедры биотехнологии и микробиологии

Серикова Н.В.

**Рецензент**

кандидат фармацевтических наук,

Зав лабораторией контроля качества

ООО «Белфармамед»

Фадеева Д.А.

**БЕЛГОРОД 2018**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	7
1.1. Общая характеристика и физиологические особенности <i>C. albicans</i> .....	7
1.2. Биохимические компоненты растений, обладающие антимикробным и фунгицидным действием.....	12
1.3. Биохимические свойства и антимикотическое действие экстрактов розмарина ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ), можжевельника обыкновенного ( <i>Juniperus communis L.</i> ), дикого ямса ( <i>Dioscorea L.</i> ), чистотела ( <i>Chelidonium majus L.</i> )..	16
1.4. Нанокapsулированные экстракты лекарственных растений, их свойства и характеристика.....	27
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1. Объекты и методы исследования.....	35
2.2. Водные и сухие экстракты растений можжевельника, розмарина и дикого ямса.....	35
2.2.1. Водные растворы нанокapsулированных экстрактов растений можжевельника, розмарина и дикого ямса.....	35
2.2.2. Методика приготовления биопленок, и их применение.....	39
2.2.3. Водные экстракты свежего сырья можжевельника, чистотела, розмарина.....	41
2.3. Методы статистической обработки результатов.....	45
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	47
3.1. Влияние растворов и пленок из сухих экстрактов розмарина и можжевельника в нативном и нанокapsулированном виде на рост <i>C. albicans</i> в культуре.....	47
3.2. Влияние растворов и биопленок из экстракта дикого ямса на рост <i>C. albicans</i> в культуре.....	49
3.3. Влияние водных экстрактов розмарина, можжевельника и чистотела в нативном и нанокapsулированном виде на рост <i>C. albicans</i> в культуре.....	50

ВЫВОДЫ.....	59
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	60

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время известно, что экстракты лекарственных растений содержат в своем составе флавоноиды, сапонины, каротиноиды, обладающие терапевтическим действием. Благодаря этим свойствам лекарственные растения используются в фармакотерапии в качестве антимикробных, противовоспалительных, спазмолитических и разных других средств. Кроме того, лекарственные препараты из вытяжек растений обладают относительной безопасностью, то есть исключают некоторые побочные эффекты ряда других лекарственных препаратов. Именно поэтому большое распространение имеет изучение антибактериальных и антимикотических свойств экстрактов растений.

Большую актуальность имеет проблема распространения антибиотикорезистентности микроорганизмов, в том числе грибов. На сегодняшний день миру известен широкий спектр антибиотиков, но антимикотической активностью обладают всего 2 класса соединений – это азолы (кетоконазол, флуконазол, клотримазол) и полиены (амфотерицин). Кроме того, данные препараты обладают высокой токсичностью и выступают как аллергены и раздражители в организме человека. Одним из перспективных направлений решения данной проблемы является поиск новых препаратов, основанных на растительном сырье, которые будут подавлять грибную активность без побочных эффектов для человека.

В литературных источниках (Ермакова, Титов, 2003; Бухарин и др., 2015; Соковнина и др., 2017) не однозначно описано антимикотическое влияние экстрактов лекарственных растений на выбранную нами культуру *Candida albicans*, часто встречающегося условно-патогенного грибка.

Научные статьи (Бирюков, Лаптев, 2017; Ермакова, Титов, 2003) указывают на то, что данный гриб проявляет фунгистическую активность в

отношении известных и часто используемых в практике лекарственных препаратов.

Научный интерес для исследования при этом представляет также установление влияния на культуру *C. albicans* нанокапсулированных экстрактов лекарственных растений.

Новизна данной работы заключается в использовании нанокапсулированных экстрактов растений и сравнительном анализе нативных экстрактов и их нанокапсулированных форм. Многие исследовательские работы основаны на нативных экстрактах, наша задача оптимизировать методику, установить экстракты (формы и дозы) проявляющие на культуру *C. albicans* наибольшее антимикотическое действие.

**Целью** данной работы является сравнительный анализ влияния нанокапсулированных и нативных экстрактов лекарственных растений на рост *C. albicans* в культуре.

Для достижения поставленной цели, нами были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Установить влияние растворов и пленок из сухих экстрактов можжевельника и розмарина в нативном и нанокапсулированном виде на рост *C. albicans* в культуре;
- 2) Определить влияние водных экстрактов можжевельника, чистотела и розмарина на рост *C. albicans* в культуре;
- 3) Оценить влияние растворов и пленок из сухих экстрактов дикого ямса в нативном и нанокапсулированном виде на рост *C. albicans* в культуре.

**Объекты:**

- Дрожжеподобные грибы вида *C. albicans*;
- Водные экстракты нативного можжевельника, розмарина, дикого ямса;

- Водные экстракты и биопленки нанокапсулированного можжевельника, розмарина, дикого ямса.

Предметы:

- Характер роста дрожжеподобных грибов рода *Candida*;
- Общая характеристика экстрактов растений;
- Антимикотическая активность экстрактов можжевельника, розмарина, дикого ямса.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ.

### 1.1. Общая характеристика и физиологические особенности

#### *Candida albicans*.

Дрожжевые грибки входящие в род *Candida* насчитывают около 150 видов. Многие виды этого рода вызывают заболевания человека и животных. Наиболее известными болезнетворными видами являются *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. guillier-mondii*, *C. glabrata*. Особое место в роду занимает *C. albicans*, являясь наиболее распространённым представителем, комменсалом и условно-патогенным микроорганизмом (Карпунина и др., 2005).

Микромицеты рода *Candida* представляют собой дрожжевые клетки с многослойной стенкой, чаще овальные или эллипсоидной формы. Размеры их колеблются в пределах 1,5 – 15 мкм. Грибы относят к несовершенным грибам (дейтеромицетам – у них полностью отсутствует половая стадия развития), их размножение происходит вегетативным путем при помощи почкования. Из почкующихся клеток они образуют нити псевдомицелия. Микромицеты чувствительны к высоким температурам, и погибают при температуре 60 – 70 ° C через несколько минут (Лисовская и др., 2007).

При микроскопии *Candida* выявляется псевдомицелий – то есть клетки соединены перетяжками, а также почкующиеся бластоспоры и мицелий с перегородками (Сергеев, 2008).

*Candida* представляют собой овальные почкующиеся дрожжевые клетки, а также имеют псевдогифы и септированные гифы. По отношению к кислороду являются аэробами. Кандиды растут на простых питательных средах, для выявления грибов используют среду Сабуро или сусло-агар. Наиболее благоприятная температура для них составляет 37 ° C. На среде образуют выпуклые, блестящие, маслянистые колонии молочного или

телесного оттенка. Вид *C. albicans* представляет крупные выпуклые колонии молочного цвета (Николенко и др., 2010).

Грибы рода *Candida* вызывают заболевания кандидоз (кандидомикоз). В последнее время кандидоз все чаще встречается как микс-инфекция, то есть помимо кандид, обнаруживаются и другие условно-патогенные микроорганизмы, такие как *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus haemolyticus*. Наличие такой смешанной формы инфекции ограничивает возможность эффективной антимикробной терапии не только в связи устойчивости бактерий к лекарственным препаратам, но в частности из-за способности кандид к иммуномодуляторным эффектам, снижающим свойства макроорганизма противостоять инфекции (Мозговая и др., 2014).

Кандиды широко распространены в природе, они встречаются во всех средах обитания – воздухе, почве, воде. Обитают на растениях, плодах и в принципе являются частью нормальной микрофлоры животных организмов, в том числе человека. Чаще всего развитие кандидомикоза возникает при нарушениях гормональных и обменных функций организма, при неправильном назначении антибиотиков, иммунодефицитах, а также нарушении покровов кожи и слизистых оболочек. Контаминация может произойти в больничных учреждениях через хирургические инструменты, перевязочные материалы, растворы, катетеры. Из всего этого следует, микромицеты могут встречаться и во внешней среде, и внутри организма (Валышев и др., 2003).

Наибольшую опасность грибы рода *Candida* представляют для ВИЧ-инфицированных больных, так как у них неэффективны или отсутствуют защитные тканевые и клеточные функции, ограничивающие рост возбудителя (Чарушина и др., 2017).

Существует несколько этапов развития кандидомикозной инфекции: адгезия – прикрепление микромицетов к поверхности слизистой оболочки, увеличение численности с образованием колоний, инвазия – внедрение в

эпителий, попадание в соединительную ткань путем преодоление эпителиального барьера слизистой, проникновение в сосуды и поражение органов (Капустина и др., 2013).

У грибов рода *Candida* существует несколько факторов патогенности. Один из них – способность к прикреплению на ткани хозяина с последующим образованием биопленок. Микромицеты способны образовывать биопленки не только на слизистых оболочках хозяина, но также и на медицинском оборудовании. Еще одним фактором патогенности является способность образовывать псевдомицелий, внедряющийся в ткани макроорганизма. После этого грибы синтезируют гидролитические ферменты, повреждающие ткани хозяина и вызывающие сенсibilизацию организма в целом. Кандиды способны адаптироваться и приобретать резистентность к фунгицидным препаратам (Шакалите и др., 2008).

У кандид хорошо развиты адгезивные свойства, которые могут быть специфическими и неспецифическими. Эти свойства проявляются за счет гидрофобных свойств клеточной мембраны. Гликопротеиновые фибриллы клеточной стенки позволяют прикрепляться грибам не только к тканям организма, но и к медицинскому оборудованию, например катетерам, эндопротезам. Так проявляется неспецифическая адгезия (Shirliff et.al., 2009).

Специфическая же адгезия осуществляется с помощью рецепторов адгезии (адгезинов). Адгезины помогают кандидам прикрепляться к эпителиоцитам. Некоторые такие рецепторы имеют большое сходство с рецепторными белками организма, что увеличивает степень адгезии за счет снижения иммунного ответа хозяина (Рамазанова и др., 2013, 52-54).

Наиболее высокая степень адгезии у видов *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, виды *C. glabrata* и *C. krusei* обладают низкой адгезивной способностью (Перунова, 2006).

При употреблении человеком глюкокортикоидных гормонов, цитостатиков, антибиотиков адгезивные свойства грибов возрастают. Кроме

того, на адгезивность влияет качество питательной среды, температура, влажность, уровень рН, а также возраст культуры – чем моложе культура, тем выше ее адгезивные способности.

*C. albicans* образуют «ростковую трубку» из бластоспоры (почки) при помещении их в сыворотку. Вид *C. albicans* также образуют хламидиоспоры – толстостенные двухконтурные крупные овальные споры. В тканях кандиды встречаются в виде псевдогиф и дрожжей (Mahboubi et.al., 2010).

*C. albicans* является наиболее часто встречающимся возбудителем кандидоза, так как продуцирует протеазы, фосфолипазы и поверхностные интегринаподобные молекулы для адгезии к экстрацеллюлярному матричному белку. Фосфолипазы активируются при рН от 3,6 до 8,6. Поэтому изменение кислотности среды определяет их активность. В клеточной мембране *C. albicans* присутствуют фосфолипазы А1 и А2, которые могут выходить за пределы клетки. Они могут отщеплять от второго атома углерода фосфолипида жирные кислоты. В результате образуется высокотоксичный продукт – лизофосфатид, который разрушает клеточные стенки и происходит внедрение в ткани организма. Они разрушают клеточные мембраны и поверхностные молекулы, а также нарушают клетки и молекулы иммунной системы. Однако есть мнение, что фосфолипазная активность присутствует и у других представителей рода, но у *C. albicans* она резко усилена (Вальшев и др., 2003).

В здоровом организме кандиды являются безвредными комменсалами желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы. Однако, при пониженном иммунитете они могут стать важными патогенами, которые вызывают ряд инфекций, таких как вагинит, инфекции ротоглотки и другие. Для пациентов, проходящих химиотерапию особенно опасно заражение крови данным грибком.

Вид *C. albicans* имеет особенность заселять кожные покровы и слизистые оболочки здоровых людей, таким образом, вызывая кандидозное

носительство. Микромицеты могут встречаться в кишечнике, во влагалище, ротовой полости, на коже, и даже на слизистых оболочках бронхов. У здорового человека сильная адаптивная и врожденная иммунная система, поэтому рост патогенных грибов ограничен. Но при ослабленном иммунитете могут вторгаться в ткань и вызывать эндогенную инфекцию. Кандидоз может передаваться детям при рождении, а также при грудном вскармливании. Если инфекция была передана половым путем, то возможно развитие урогенитального кандидоза (Куликов и др., 2012).

Грибы рода *Candida* выделяются в человеческом организме в трех различных морфологиях: дрожжах, псевдогифах и гифах. Псевдогифы и гифы имеют удлиненную форму, в большинстве случаев их трудно отличить друг от друга, так как они имеют нитчатую структуру (Кашкин и др., 1983).

Яркой особенностью *C. albicans* является ее способность расти в различных морфологических формах. Форма может варьироваться – от одноклеточных почкообразных дрожжей до настоящих длинных переплетающихся между собой гиф. В псевдогифах дочерняя клетка удлиняется, а после образования перегородки остается прикрепленной к материнской клетке. В результате образуются нити, состоящие из удлиненных клеток, и в местах сужения образуются перегородки. Такие псевдогифы могут настолько растягиваться, что нити внешне будут напоминать гифы. Поэтому часто используют одно общее название для гиф и псевдогиф – нитевидные (Langford et.al., 2010).

По мере роста колоний происходит изменение в структуре. Дрожжевые клетки обычно образуют гладкие, белые, куполообразные колонии. Однако штамм *C. albicans* может изменять форму колоний – звезда, кольцо, нечеткие края, в которых грибы могут состоять из смеси дрожжевых и нитевидных клеток.

Белые колонии имеют в основном нормальную морфологию дрожжей – овальные клетки. Мутные колонии содержат продолговатые клетки, имеют пупырышки на поверхности клеточной стенки (Быкова и др., 2011).

Гифы и псевдогифы являются инвазивными, то есть они вторгаются в субстрат агара, когда они растут в лаборатории. Существует мнение, что данное свойство способствует проникновению грибов в ткани на ранних стадиях инфекции, так как дрожжевая форма – наиболее подходящая для распространения в кровотоке. Однако большинство диморфных грибов проявляют рост путем почкования в пораженные ткани, а вне организма растут как мицелиальные грибы.

Гифы хорошо индуцируются из клеток дрожжей путем добавления сыворотки и температуре 37 ° C. Температура культивирования выше 35 градусов и нейтральный pH также индуцируют гифы и псевдогифы.

Различить гифы от псевдогиф можно по форме ячейки. Гифы развивают бластоспоры, не имеют сужения на шейке материнской клетки и имеют одинаковую форму по всей длине. Формирование нитей в ответ на сыворотку является основным тестом, который используется в клинических лабораториях для того чтобы отличить *C. albicans* от других видов *Candida* (Перунова, 2006).

## 1.2. Биохимические компоненты растений, обладающие антимикробным и фунгицидным действием

Растительные экстракты лекарственных растений богаты фенолами, алкалоидами, флавоноидами, танинами, стиролами и терпеноидами, которые оказывают ингибирующее воздействие на микроорганизмы. Кроме того, данные вещества проявляют иммуномодулирующее действие на организм человека. В настоящее время широко распространено изучение этих биологически активных веществ, оказывающих не только

антибактериальный, но и антигрибковый, противовирусный, антипротозойный эффекты (Челпаненко и др., 2014).

Эфирные масла растений содержат синтезируемые ароматические субстанции, представленные фенолами или их кислородсодержащими производными: танины, кумарины, хинины, фенольные кислоты, флавоноиды, терпеноиды и их компоненты (Zore, 2011).

В соответствии с данными, известными на сегодняшний день, антифунгальным эффектом обладают эфирные масла, терпены и терпеноиды, флавоноиды, фенолы и феноловые кислоты, танины, лектины, кумарины и полипептиды (Rao et.al., 2010).

Флавоноиды имеют свойства встраиваться в клеточные стенки бактерий аналогичны хинонам, а также связывать внеклеточные и растворимые протеины (Espina et.al., 2011).

Танины являются фенольными полимерными веществами. Они образуют желатин в растениях, содержатся в корнях, плодах, листьях и семенах. Благодаря танинам стимулируется фагоцитарная способность клеток, активизируется противоопухолевая активность. Антимикробное воздействие танинов схоже с флавоноидами: они инактивируют микробную адгезию, энзимы, а также нарушают транспорт протеинов, образуя при этом комплекс с полисахаридами. Танины оказывают токсическое воздействие на грибной мицелий (Prabuseenivasan et.al., 2006).

Кумарины являются фенольными соединениями. Характерный запах растениям придают как раз данные вещества. Кумарины обладают противовоспалительным, вазодилатирующим, антитромботическим действием. Опыты *in vitro* показывают ингибирующее влияние кумаринов на микромицет *C. albicans*. Кумарины также стимулируют макрофаги, которые продуцируют гидролитические ферменты, бактерицидные вещества и свободные радикалы (Kavanaugh et.al., 2012).

Терпеноиды (метанол, камфорное масло, артемизин, фарнезол) синтезируются из уксусной кислоты, участвуют в метаболизме жирных кислот. Терпеноиды также характеризуются атимикробным, антифунгальным, антипротозойным, противовирусным действием. Механизмы действия данных веществ до конца не изучены. Известно, что они способны включаться в липофильные компоненты клеточных мембран, вызывая их разрыв (Calo et. al., 2015).

Фенольные соединения состоят из замещенного фенольного кольца. Известные представители – кофейная и коричная кислоты. Полынь и тимьян, содержащие кофейную кислоту, обладают антивирусной, фунгицидной и атимикробной активностью. Катехолы и пираголлы также являются представителями фенолов, являются токсичными в отношении микроорганизмов (Ибрагимова и др., 2010).

Фарнезол – вещество, обладающее активностью в отношении грибков *Candida spp.*. Оно изменяет окраску колоний, влияет на образование гиф, а также нарушает процесс биопленкообразования, благодаря продукции и аккумуляции кислородных реактивных веществ, которые ингибируют электронно-транспортную цепь. Оказывает токсический эффект на *S. albicans* и *Aspergillus nidulans* (Yu et.al., 2012).

Известно, что на культуру *S. albicans* оказывают ингибирующее воздействие терпеноидные компоненты. В состав терпеноидов входит ряд веществ: эвгенол, тимол, карвакрол. Данные компоненты тормозят рост грибов, а также влияют на процесс образования биопленок и множественную резистентность к лекарственным препаратам. Карвакрол входит в состав тимьяна, орегано, гвоздики, корицы. Эфирные масла этих растений разрушают клеточную мембрану, вызывают разрыв цитоплазматической мембраны микроорганизмов, замедляют рост грибов и бактерий (Rattanachaikunsopon et.al., 2010; Xu, 2008).

Фунгицидное действие лекарственных растений зависит от физико-химических свойств, от наличия терпеноидного ароматического фенольного кольца со свободными гидроксильными группами. В данном случае наиболее активными соединениями являются тимол, карвакрол, эвгенол и амиодарон (рис.1.).

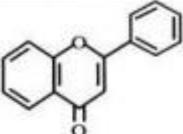
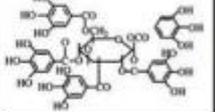
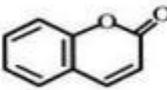
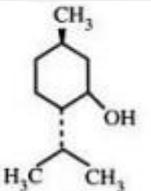
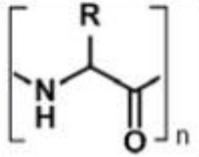
Классы соединений	Типичные соединения	Обобщенная структура	Прямой антимикробный эффект		Непрямой антимикробный эффект (иммуномодулирующий)
			Антигрибковый эффект	Антибактериальный, противовирусный эффект	
Флавоноиды	Катехины, кверцетин, кемпферол, хризин, нарингенин, галангин, цианитидин		<i>Candida</i> spp.	<i>Shigella</i> spp., <i>V. cholerae</i> O1, <i>Str. mutans</i> , Грам+ бактерии, <i>Coxsackievirus</i> , RSV; HIV	Противовоспалительный эффект (IL-6, IL-8, TNF-α)
Танины	L-танин		Неспецифическая антигрибковая активность	Неспецифическая антибактериальная активность	Стимуляция фагоцитарных клеток
Кумарины	Варфарин, фито-алексины		<i>Candida</i> spp.	Грам+ бактерии HSV-1	Стимуляция фагоцитарных клеток
Терпеноиды и эфирные масла	Ментол, фарнезол, карвакрол, тимол, эвгенол, амиодарон, куркумин		<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> <i>L. monocytogenes</i> , <i>H. pylori</i> ,	Противовоспалительный эффект (IL-12, IL-6, TNF-α)
Лектины и полипептиды	Маннозо-специфический агглютинин, фабатын		<i>Candida</i> spp.	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> и др., Грам-, <i>E. hirae</i> Грам+ бактерии HIV	

Рис.1. Антимикробное действие соединений, входящих в состав лекарственных растений (Челпаненко и др., 2014)

Известно, что в современном мире у грибов вырабатывается резистентность к антимикотическим препаратам, поэтому использование лекарственных растений не только помогает подавлять грибную активность прямым воздействием, но и использовать растительные экстракты для устранения препятствий устойчивости микозов в отношении противогрибковых средств. Такая реакция фитосредств называется хемосенсибилизацией. У противогрибковых препаратов вместе с

лекарственными экстрактами образуется синергизм, и в результате грибки становятся более чувствительны к действию лекарственных средств (Hosseini et.al., 2013).

Синергетический эффект в отношении грибков *Candida spp.* выявляется в наибольшей степени у эфирных масел, катехинов, алкалоидов, полифенолов и терпеноидов. До конца не выявлено, с чем связано такое взаимодействие, однако, считается, что изменяется ионный гомеостаз, тем самым снижается биопленкообразование у грибков, а также нарушается синтез эргостерола, изменяется синтез фолиевой кислоты (Bruce et.al., 2012).

1.3. Биохимические свойства и антимикотическое действие экстрактов розмарина (*Rosmarinus officinalis*), можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis L.*), дикого ямса (*Dioscorea villosa L.*) и чистотела (*Chelidonium majus L.*).

Розмарин лекарственный (*Rosmarinus officinalis*) – относится к семейству Яснотковые (*Lamiaceae*), рода Розмарин (*Rosmarinus*). Растение относится к полукустарниковым вечнозеленым растениям, высотой от 50 до 200см.

Растение имеет широкий ареал распространения. Оно произрастает в ряде стран Северной Африки (Тунис, Марокко, Ливия, Алжир), так же на Кипре, в Турции, и в некоторых странах юга Европы – Италия, Испания, Португалия, Франция, Греция. Растет в основном в горных районах на сухих склонах. В России не растет в диком виде, однако в Крыму выращивается как культурное растение (Муравьева и др., 2002).

Листья розмарина линейные, вечнозеленые, тупые на конце на коротких черешках. Края толстые, завернутые. Ветви опушенные, тупочетырехгранные. Цветки сидячие, находятся на концах коротких побегов. Находятся в 5-10 ложных кистях. Венчик слегка опушенный сверху,

сине-фиолетового цвета. Верхняя губа цветка выемчатая, чуть короче нижней, нижняя с зубчатой средней лопастью по краям. Плодом является орешек округло-яйцевидной формы буроватого цвета. Цвести начинает с середины весны, в апреле-мае. Плоды созревают к сентябрю (Тохсырова и др., 2016).

Стебли розмарина имеют богатый химический состав, в них обнаруживаются дубильные вещества, алкалоиды (розмарицин), розмариновая кислота. Также в растении содержится эфирное масло (розмариновое). Наибольшее количество масла выявляется в период цветения и в период осыпания плодов. Эфирное масло розмарина содержит цинеол, камфен,  $\alpha$  – пинен, борнеол, камфору (Полухина и др., 2016).

Розмарин имеет 3 хеморасы, и в зависимости от них существенно различается состав эфирного масла. Существует вербеновая, цинеольная и камфорная хемораса. В эфирном масле вербеновой расы преобладающее количество веществ вербенона и борнилацетата. Такое эфирное масло оказывает желчегонное, кардиотоническое и мочегонное действие. Цинеольная – 2 раса, насыщена цинеолом. Это эфирное масло обладает антисептическими свойствами, используется в очищении дыхательных путей и в качестве противоревматического средства. Третья раса – камфорная, ее масло воздействует как кардиотоническое средство в малых дозах, а в больших является релаксантом, уменьшает застой крови. Розмариновое масло нельзя применять в больших дозах, в противном случае можно спровоцировать кровотечение десен, стеатоз печени (Зорин и др., 2007).

Розмарин широко используется в кулинарии, является популярным пряным растением, так как обладает сладковатым камфорным ароматом, схожим с запахом сосны, и пряным, островатым вкусом. В качестве пряности используются цветки, побеги и листья в свежем или высушенном виде. Применяется для обработки рыбы, а также добавляется в супы, салаты, мясные блюда, грибы и маринады.

Эфирное масло розмарина используется в хлебопекарной, ликероводочной, а также парфюмерной и косметической промышленности.

Кроме того, данное растение имеет распространение и в медицине. Он способствует выделению желудочного сока и улучшению пищеварения в целом. Доказано, что водный настой из розмарина повышает давление, увеличивает частоту сокращения сердца, а также обладает тонизирующим и желчегонным действием, снимает нервное напряжение. Вместе с тем розмарин еще обладает свойством улучшать зрение, память и мозговое кровообращение (Abdullah et.al., 2010).

Летучие вещества, содержащиеся в растении, помогают при простудных заболеваниях, они очищают воздух помещения от патогенных микроорганизмов. Стафилококки, стрептококки, дрожжевые грибки, а также кишечная палочка поддаются влиянию розмарина (Скоробогатова и др., 2010).

Розмарин имеет широкое распространение в народной медицине, его используют как седативное в климактерическом периоде, в качестве болеутоляющего, при невритах, ревматизме, а также при аменорее. Розмарин входит в состав лекарственного препарата Канефрон, который применяется при заболеваниях почек и инфекции мочевыводящих путей (Полухина и др., 2016).

В Тунисе учеными были проведены опытные исследования по антимикробной активности эфирного масла розмарина. В опытах использовались микроорганизмы, вызывающие кишечные инфекции: *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*. В результате масло розмарина подавляло данную микробиоту, что показало перспективу использования розмарина в фармацевтической и пищевой промышленности (Abdullah et.al., 2010).

В Пятигорском медико-фармацевтическом институте изучили антимикробное действие эфирного масла побегов розмарина. В качестве сырья студенты использовали розмарин, произрастающих на территории ботанического сада региона Кавказских Минеральных Вод. Эфирное масло гидродистиллировали. Антимикробную активность определяли на 7 штаммах микроорганизмов: *C. albicans*, *Proteus vulgaris*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*. Микроорганизмы сеяли сплошным газоном на питательный агар и вносили эфирное масло в концентрации 0,5 и 3,0 петлей в центр чашки, после чего термостатировали при температуре 37 ° C в течение 18-24 часов. В результате была обнаружена наибольшая антимикробная активность в отношении *Enterococcus faecalis* и *S. aureus*, меньшую активность масло проявило на *C. albicans* и *Escherichia coli*. На другие же культуры микроорганизмов масло розмарина не оказало антимикробного действия (Тохсырова и др., 2015).

Пакистанские ученые провели исследования количественного и качественного состава эфирного масла розмарина. Оказалось, в растении ведущим компонентом, выражающим антимикробную активность, являлся 1,8 цинеол. Антимикробная активность была выявлена в отношении ряда микроорганизмов: *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella poona*, *E. coli* (Almadiy et.al., 2016).

В Гродненском государственном университете совместно с МГУ имени М.В. Ломоносова Провели исследования по влиянию водных настоев растений на дрожжевые грибы, в том числе культуру *C. albicans*. Исследователи готовили водные настои растений и воду для контроля. В готовые настои вносили взвесь дрожжевых культур. Через 24 часа готовили серию разведений, которые потом высевали в глюкозно-пептонный агар с последующим учетом роста колоний. Влияние оценивали по отношению к контролю. В результате плоды можжевельника оказали стимулирующее

действие на культуру *C. albicans*. Розмарин и чистотел оказали ингибирующее действие на грибки (Годовалов и др., 2017).

В лаборатории травянистых пестицидов, в центре углубленного изучения ботаники изучали противогрибковую, токсикогенную, антиоксидантную активность эфирного масла розмарина лекарственного и его основных соединений. Использовали несколько видов грибов. Наиболее токсикогенным был грибок *Aspergillus flavus*. Данный штамм выделяет афлотоксин В1, который обладает токсическим, тератогенным, мутагенным свойствами. Для исследования ученые брали свежие листья розмарина, произрастающего на территории ботанического сада Индийского университета. Свежие листья (500 г) подвергали гидродистилляции. Через 4 ч экстрагировали эфирное масло в стерильный стеклянный флакон. Воду удаляли путем добавления безводного сульфата натрия и хранили при температуре 4 °С в темноте до использования. Противогрибковую активность тестировали с помощью контактного анализа методом дисков.

В результате обнаружилась противогрибковая и подавляющая афлотоксин минимальная концентрация действующих веществ розмарина. Кроме того, авторы пишут, что данное сырье можно использовать с различными поверхностно-активными веществами с помощью современных методов нанокапсулирования, тем самым увеличить воздействие и удалить нежелательные ароматические остатки (Prakash et.al., 2015).

В Китае, в лаборатории экологии лесных растений содружество и нескольких университетов изучил химический состав и противомикробную активность эфирного масла розмарина. Исследования проводились на 8 штаммах микроорганизмов. В их числе использовали и грибок *C. albicans*. До начала эксперимента грибок инкубировали на косом агаре при температуре 37 °С в течение суток. Эфирное масло розмарина получали путем пародистилляции. Образец штамма грибка растворяли в стерильном физиологическом солевом растворе. Последовательные разведения масла

готовили в 96-луночном планшете для микротитрования в диапазоне 4.0-0.2%. Минимальная ингибирующая концентрация принималась самая низкая концентрация образцов, при которой микромицеты не демонстрировали видимого роста. В результате эфирное масло розмарина показало выраженную противогрибковую активность против штамма *C. albicans* (Yang et.al., 2011).

Можжевельник обыкновенный (*Juniperus communis* L.) относится к семейству кипарисовые (*Cupressaceae*), классу хвойных (*Coniferae*). Растение представляет собой двудомный кустарник, от 1 до 3 метров в высоту, либо же деревце в высоту до 8 метров. Имеет колючую хвою, расположенную мутовками по 3 иглы в каждой. Шишки семенные (женские) и пыльниковые (мужские) сидят на разных особях. Первый год жизни шишки остаются зелеными, они созревают, и становятся черными на второй год. Семенные шишки представляют собой несколько мутовок по 3 чешуи в каждой. На самой верхней мутовке находятся плодоносящие чешуи, в пазухах которых сидит по одной семечке. После оплодотворения чешуи становятся мясистыми, срстаются и образуется ягодная шишка (шишкоягода) (Муравьева и др., 2002).

Ареал распространения можжевельника – северная и средняя европейская часть России, Западная Сибирь, ряд европейских стран, Северная Америка.

Плоды можжевельника содержат от 0,5 до 2 % эфирного масла, в составе которого около 70 различных компонентов. В состав масла входят камфенсабинен,  $\beta$ -пинен, борнеол, изоборнеол, лимонен, терпинеол, ландрен,  $\alpha$  -,  $\beta$ -кадинены.

Эфирное масло, обеспечивающее фитонцидное действие можжевельника, содержится не только в шишкоягодах, но и в побегах, хвое, древесине.

В плодах можжевельника также обнаруживаются смолы, сахара, пектиновые вещества, органические кислоты (муравьиная, уксусная, яблочная).

В качестве лекарственного сырья используют шишкоягоды. Сбор их проходит осенью, в период полного созревания. После сбора ягоды сушат на воздухе, содержание влаги не должно превышать 20% (Бухарин и др., 2015).

Можжевеловые ягоды используют в качестве мочегонных средств. Эфирное масло плодов, выделяясь через почки оказывает умеренно-раздражающее действие, что способствует увеличению диуреза. Кроме того, масло оказывает противовоспалительное и антисептическое действие на мочевыводящие пути. Имеются противопоказания в применении при нефритах и нефрозонофритах (Фролова и др., 2010, 1-10).

В составе эфирного масла растения имеются активные вещества с фунгицидными свойствами. Эфирное масло растений рода *Juniperus* L. является сильными фунгицидом.

В Сибирском федеральном университете провели исследования по воздействию эфирных масел Сибирского региона на условно-патогенные микроорганизмы. Среди всех исследовался и можжевельник обыкновенный. Выяснилось, что *Juniperus communis* проявляет высокую активность в отношении ряда микроорганизмов, таких как *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. Aureus*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae* (Струкова и др., 2009).

Ряд научных сотрудников из научного центра исследования природы в Вильнюсе провели исследования по чувствительности дрожжей рода *Candida* к эфирным маслам чайного дерева и пихты сибирской. Можжевельник относится к порядку Хвойные (*Pinales*), поэтому антимикотические свойства пихты сибирской могут быть такими, как и у можжевельника.

Оказалось, концентрированное эфирное масло пихты сибирской сильно подавляло рост дрожжей рода *Candida*, размеры зон ингибирования колебались в пределах от 18,5 до 29,0 мм. Воздействие 25%-ого раствора

эфирного масла пихты сибирской было похожем, размеры зон ингибирования колебались в пределах от 18,5 до 29,0 мм. 1%-ные растворы масла не влияли на рост дрожжей рода *Candida*. Таким образом, авторы доказали бактерицидное действие эфирного масла пихты сибирской на микроорганизмы (Швядене и др., 2014)

Сотрудники лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института УрО РАН провели исследования об обосновании выбора антимикотических препаратов. В своей работе они использовали 42 штаммов грибов *C. albicans*. Эффективность воздействия лекарственных растений на микромицеты проводили под контролем изменений экспрессии липолитической и антилизоцимной активности грибков. Для исследования использовали большое количество растений, в том числе и экстракт можжевельника. Для приготовления растительных экстрактов измельчали сырье, заливали водой и кипятили на водяной бане в течение 15 минут. Затем охлаждали и процеживали. Приготовленные экстракты смешивали с мясопептонным агаром. После этого в приготовленные смеси засеивали культуру грибков и инкубировали в термостате 1 час, после чего проверяли антилизоцимную активность. Контролем служили взвеси микромицетов, выращенные без фитосредств. В результате оказалось, можжевельник обладает антилизоцимной, а также липолитической активностью (Капустина и др., 2013).

Уткина Т.М., Потехина Л.П. устанавливали влияние хвойных растений на персистентные свойства *C. albicans*. Персистентный потенциал *C. albicans* влияет на длительность переживания грибков в организме человека, поэтому идет активное изучение фитопрепаратов, подавляющих персистентный потенциал. Исследователи использовали 9 растительных экстрактов хвойных растений, в том числе два вида можжевельника – сибирского и казацкого. В результате оба вида снижали антилизоцимную активность грибков (Уткина и др., 2014).

Ряд ученых отделения микробиологии факультета фармации и биохимии университета Хорватии изучали противомикробную активность эфирного масла плодов можжевельника обыкновенного. В качестве тест-культур использовали 16 видов бактерий и семь дрожжеподобных грибов, среди которых и штамм *C. albicans*. Эфирное масло получали из сушеных можжевельных ягод путем газовой хроматографии. Дрожжи культивировали на среде Сабуро с добавлением декстрозного агара и хлорамфеникола и инкубировали в течение 5 дней при температуре 25 °С. Далее делали лунки диаметром 6 мм в среде, и добавляли эфирное масло можжевельника. Чтобы ускорить распространение масла в агар, планшеты инкубировали при 4 °С в течение 1 ч и затем инкубировали при 37 °С в течение 18 ч в аэробных условиях. Минимальную ингибирующую концентрацию определяли методом двукратного микроразведения. В результате, для грибка *C. albicans* минимальная ингибирующая концентрация составила 1% эфирного масла (Pepeļnjaki et al., 2005).

Дикий ямс - обобщённое название растений рода Диоскорея (*Dioscorea L.*) относится к семейству Диоскорейные. Род диоскорея насчитывает более 800 видов. Ареал распространения - тропики и субтропики. В России растение произрастает на территории Краснодарского края (*Dioscorea caucasica*) в разреженных дубовых лесах на высоте до 1000 метров над уровнем моря и на Дальнем Востоке (*Dioscorea nipponica*) в смешанных и широколиственных лесах.

Растение многолетнее, представляет собой двудомные травянистые лианы с длинным (около 4 метров), вьющимся стеблем. Листья диоскореи черешковые, очередные, у некоторых видов сердцевидные, лопастные или яйцевидные, в длину от 3 до 16 см. Стебли простые, голые. Корневище сильно разветвленное, горизонтальное, плотное, коричневатое-бурое, длиной от 1,5 до 2 метров и толщиной 2 см. Цветки у растения мелкие, зеленые, раздельнополые. Пестичные и тычиночные цветки собраны в соцветия на

разных растениях. Плод – коробочка с тремя перепончатыми крылышками, семена тоже окаймлены крыльями. Период вегетации с мая по июль (Муравьева и др., 2002).

Корневища диоскореи содержат сапонины (до 10%), в число которых входит стероидный сапонин – диосцин (1,5%), который при гидролитической реакции освобождает диосгенин, глюкозу и 2 молекулы рамнозы.

В качестве лекарственного сырья используют корни. Собирают корневища летом или осенью, режут и затем высушивают. Высушенные корневища снаружи бурые, на изломе бежевые с пучками темных точек. Вкус слегка жгучий, горьковатый.

В фармакологии дикий ямс используется для получения стероидных гормонов. Применяется в качестве комплексной терапии при атеросклерозе как гипохолестеринемическое средство.

Описание использования дикого ямса в качестве антимикотического препарата нет, однако данное растение содержит высокую концентрацию биологически активных веществ, и возможно обладает некоторым антисептическим действием.

Чистотел (*Chelidonium majus L.*) относится к семейству маковые (*Papaveraceae*), является многолетним травянистым растением. Его высота колеблется в пределах от 30 до 100 см. Его отличительной чертой является наличие млечного сока оранжевого цвета во всех органах. Листья зеленые, снизу сизоватые, очередные, нижние черешковые, стеблевые сидячие. Пластинки листьев с извилистолопастными, надрезанно-городчатыми долями, в очертании – непарно-перисто-раздельные, широкоэллиптические. Цветки представляют собой зонтичные соцветия, венчик собран четырьмя ярко-желтыми лепестками, в чашечке два чашелистика. Пестик с удлинённой одногнездной завязью, которая развивается в стручковидную коробочку до 5 см. Тычинки многочисленные (Бирюков, Лаптев, 2017).

Ареал распространения чистотела – европейская часть России, Кавказ, Сибирь, Дальний Восток. Не является культурным растением, встречается как сорняк в огородах, садах, близ жилья.

Чистотел содержит алкалоиды во всех частях растения, их число может достигать от 2 до 4 %. Алкалоиды являются очень сложными по своей структуре, относятся к изохинолиновым производным. Они содержат в своем составе протопин, аллокриптонин, берберин, коптисин, хелидонин, сангвинарин, хелетрин и другие. Данные алкалоиды в чистотеле могут быть как в свободном, так и связанном состоянии, например вместе с хелидоновой кислотой. Кроме алкалоидов, чистотел содержит флавоноиды, сапонины, каротиноиды, аскорбиновую, лимонную, яблочную и янтарную кислоты. Окраску млечному соку растения придает берберин (Погоцкая и др., 2010).

В качестве лекарственного сырья используют цветущую траву с незрелыми плодами. Может использоваться, как в виде цельного, так и измельченного сырья.

Траву чистотела используют в медицине для прижигания кондилом, бородавок, при начальных формах красной волчанки, а также образовании папиллом в гортани. Настой из чистотела используют при заболеваниях желчного пузыря и печени, а также в качестве желчегонного и бактерицидного средства. Кроме того, экспериментальные данные показывают, что препараты из сырья данного растения задерживают рост злокачественных опухолей, оказывают бактериостатическое и фунгицидное действие на микобактерии туберкулеза (Куркин и др., 2007).

Ряд авторов. описывали сравнительный анализ антимикробной активности лекарственных растений. В числе данных растений был и чистотел. Исследователи делали экстракты чистотела в физиологическом растворе и проверяли активность на микроорганизмах *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*. В результате зоны подавления роста составляли от 0,11 до 10,3 мм для разных культур (Фролова и др., 2006)

### 1.3. Нанокapsулированные экстракты лекарственных растений, их свойства и характеристика.

Нанокapsулирование является подразделом инкапсулирования. Инкапсулирование представляет собой процесс измельчения жидких, газообразных и твердых веществ, которые в последствии упаковываются в оболочку для защиты воздействий окружающей среды. Таким образом капсула есть ни что иное как контейнер, защищающий ингредиент внутри от окисления, испарения или загрязнения. Инкапсулирование подразделяется на биокапсулирование, нанокapsулирование и микрокапсулирование. Размер капсул колеблется в пределах от одного микрона до семи миллиметров. Чаще всего используются частицы размером несколько микрон. Невооруженным глазом невозможно увидеть продукты инкапсулирования, однако при микроскопировании на площади в 1 квадратный сантиметр могут обнаруживаться до 1 миллиона капсул (Кролевец и др., 2013).

Нанокapsула (другое название коллоидосома) – это наночастица, которая состоит из липидной, полимерной или другой оболочки, окружающей ее содержимое и внутреннюю полость от воздействий окружающей среды. Чаще всего капсулы имеют сферическую форму. Оболочка нанокapsул образована полимерами или фосфолипидами (липо – и наносомы), внутри которой заключено низкомолекулярное вещество. Также оболочка нанокapsул может быть изготовлена из других материалов. Задача оболочки защищать капсулированное вещество от нежелательного воздействия. Нанокapsула должна отвечать ряду требований – обладать химической активностью, стабильностью, быть совместимой с организмом (Donsi et.al., 2011).

Нанокapsулы обладают высокой проникающей способностью, могут проходить даже через закрытые зоны организма, например, головной мозг

или плаценту. Геометрия нанокапсулы влияет на их способность проникать в раковые клетки. Так, сферические капсулы проникают быстрее и легче, чем палочковидные (Bozzuto, Molinari, 2015).

Нанокапсулированные препараты имеют широкий спектр применения – от противоопухолевых средств до препаратов косметологии. Нанокапсулы используют для контролируемого введения биологически активных веществ (лекарственных препаратов, пептидов, белков) а также генетических конструкций, несущих гены цитокинов, гормонов и ферментов.

Нанокапсулы содержат жидкое ядро, окруженное твердой оболочкой. Размер их измеряется в нанометрах. Нанокапсулированные препараты являются молодым, но перспективным направлением в разных отраслях промышленности, в частности в пищевой и фармацевтической. Все чаще в фармации используются препараты в нанокапсулах для пролонгации действия, либо же для защиты желудочно-кишечного тракта. (Alvarez-Paino et.l., 2017)

Нанокапсулированные препараты получают несколькими способами. Первый из таких способов – физико-химический. Данный метод заключается в коацервации, с последующим осаждением растворителем. Далее образуется новая фаза при изменении температуры, происходит выпаривание летучего газообразного соединения, расплавы отвердевают в жидких средах. Затем происходит высушивание распылением и физическая адсорбция.

Другим способом получения нанокапсул является химический метод. В данном методе смешиваются полимеры, в результате чего образуется новая фаза, затем она поликонденсируется и полимеризуется.

Третий способ – физический. Происходит напыление в псевдооживленном слое, далее экструзия и конденсация пара.

Это наиболее распространенные общие методы приготовления нанокапсулированных препаратов, однако на практике чаще используются

комбинированные методы, которые позволяют добиться наиболее совершенного препарата (Кролевец и др., 2013).

Нанокапсулирование имеет ряд преимуществ перед обычными препаратами. Так, например, жидкие вещества могут быть заключены в твердую оболочку; неприятный вкус или аромат может быть замаскирован в пищевом продукте; лекарственные препараты можно защитить от воздействий окружающей среды, а также продлить длительность действия.

Высвобождение активного вещества из нанокапсул можно проводить разными способами. В зависимости от состава оболочки, ее можно растворить в воде, либо проводить диффузию через нее. Так же активное вещество может освобождаться механическим разрушением оболочки (Valencia- Sullca et.al, 2016).

Для получения нанокапсулированных экстрактов лекарственных растений можно использовать способ микрокапсул с использованием распылительного охлаждения. Для этого должен обеспечиваться ряд условий: температура воздуха входе – 10 °С, температура на выходе – 28 °С, скорость вращения, распыляющего барабана- 10 тысяч оборотов в минуту. Такие капсулы обладают стабильностью, а также обеспечивают регулируемое или пролонгированное высвобождение активного ингредиента. Но у такого метода есть и недостатки – процесс довольно длительный, применение специального оборудования и сложность выполнения комплекса условий (Кролевец и др., 2013).

Эфирные масла растений обладают противомикробной активностью и поэтому обладают большим потенциалом в качестве альтернативы опасным для здоровья синтетическим препаратам. Несмотря на свою эффективность, их применение не имеет широкого распространения из-за некоторых особенностей, а именно: низкая растворимость в воде, биодоступность, летучесть и нестабильность в пищевой системе. Продвижение в области нанотехнологий имеет потенциал для устранения этих существующих

препятствий. Применение наноматериалов в качестве оболочки сырья с недавних пор набирает интерес для повышения эффективности хранения активных веществ и их сохранения в низких дозах. Наноэмульсии, микроэмульсии, твердые липидные наночастицы и липосомы все чаще используются в настоящее время для инкапсулирования растительных биологически активных соединений (Alvarez-Piano et.al., 2017).

Уменьшение размера частиц увеличивает отношение поверхности к объему, которое повышает их реакционную способность и предлагает множество уникальных и новых особенностей.

Нанокапсулирование имеет многочисленные преимущества, такие как простота в обращении, стабильность, защита от окисления, контролируемое высвобождение, с наименьшим или вовсе без отрицательного воздействия на макроорганизм. Следовательно, использование нанотехнологий основе эфирных масел могут повысить их эффективность (Donsi et.al., 2014).

В индийском университете углубленного изучения ботаники были проведены исследования нанокапсулированных экстрактов растений. Выяснилось, что нанокапсулированные летучие соединения растений (терпены, лимонен) проявили усиленную антибактериальную активность против микроорганизмов а именно *Lactobacillus delbrueckii* и *E.coli*. Кроме того, ученые изучали антимикробную эффективность масла кардамона, инкапсулированного в наночастицы на основе хитозана. В результате нанокапсулированный экстракт продемонстрировал антимикробный потенциал против *E coli* и *S. aureus* (Hosseini et.al., 2013).

Натуральными нанокапсулирующими материалами являются хитозан, циклодекстрин, альбумин, глобулин, мальтодекстрин, крахмал. Они защищают эфирные масла растений от внутренних и внешних факторов, таких как pH, вода, ферментативная деградация, температура, относительная влажность и среда хранения (Gomez et.al., 2011).

Был предложен широкий спектр наночастиц, а именно: полимерные наночастицы; твердые липидные наночастицы и наноструктурированные липиды; жидкие кристаллические нано- и микроэмульсии, липосомы. Однако эти методы имеют ряд ограничений: физическая и химическая стабильность, совместимость с капсулами, высокая. Поэтому перед составлением нанокапсулирующего материала рассматривают многие факторы. Проверяют полярность активных соединений, доступность (Shildhaye et.al., 2008).

Липосомы – это самосборная сферическая коллоидная структура, состоящая из фосфолипидных слоев, которые включают либо водный, либо липид-растворимый материал. Основой формирования липосом является гидрофильно-гидрофобный баланс между фосфолипидами и водорастворимыми материалами. Фосфолипиды обладают способностью образовывать мембранную структуру при дисперсии в водном растворе, их полярные головки взаимодействуют с водной средой (Bozzuto, Molinari, 2015).

Благодаря этим свойствам они могут быть использованы в качестве носителей как для липофильных, так и для гидрофильных молекул. В зависимости от методов подготовки было предложено несколько групп липосом системы, а именно небольшие однослойные везикулы, большие однослойные везикулы и многослойные везикулы (Atrooz et. al., 2011).

Ученые Чикаго подготовили антимикробную пленку эвгенола и листьев корицы с использованием липосом лецитина и сообщили, что инкапсуляция на основе липосом демонстрирует улучшенную растяжимость пленки с увеличением барьерной способности водяного пара (Valencia-Sullca et. al., 2016).

Твердые липидные наночастицы представляют собой коллоидные носители, используемые в качестве альтернативной системы существующих традиционных носителей, таких как эмульсии, липосомы и полимерные микро- и наночастицы. Они состоят из биосовместимых и биоразлагаемых

липидов, которые находятся в твердой форме. Эта система широко используется в качестве агента-носителя для химически нестабильных гидрофобных соединений. Частицы образуют липофильную матрицу путем гомогенизации масла вместе с гидрофильным эмульгатором (Chang et. al., 2012).

Твердые наночастицы могут значительно улучшить физическую и химическую стабильность, а также биодоступность гидрофобных противомикробных препаратов, таких как эфирные масла растений и их биологически активные соединения.

Размер частиц и площадь поверхности нанокапсулирующих материалов играют важную роль в контроле скорости высвобождения растительных экстрактов через оболочку капсулы. Поэтому необходимо создать химическую стабильность нанокапсул. Для этого необходимо преобразовать наносуспензию в твердую форму (Acevedo-Fani et. al., 2015).

В настоящее время для сушки капсул применяется распылительная сушка для контроля и поддержания скорости высвобождения биоактивных летучих соединений в твердой форме. Техника лиофилизации используется для удаления водяного пара из наночастиц. Этот процесс может отрицательно повлиять на химические свойства материала покрытия; поэтому нужно тщательно подбирать покрывной материал нанокапсул для сохранения общего качества содержимого.

Технология распылительной сушки - это быстрый, экономичный и простой процесс, который приводит к формированию частиц сферической формы. Поэтому данная технология широко используется в промышленности для капсулирования различных ароматизаторов, витаминов, минералов, красителей и масел для продления срока годности и увеличения функциональности (Al-Haj et. al., 2010).

Нанокапсулированные растительные экстракты лекарственных растений можно использовать как безопасную альтернативу синтетическим

препаратам. Поскольку эфирные масла растений представляют собой «летучий коктейль» из нескольких биологически активных соединений (терпенов, терпеноидов, фенолов и других), то данные вещества могут одновременно нацеливаться на разные участки и нарушать гомеостаз микробов, поэтому вероятность развития резистентности маловероятна (Kujur et. al., 2017).

Механизм действия эфирных масел зависит от соотношения в нем биологически активных веществ. В целом, комплекс таких веществ отрицательно взаимодействуют с биохимическим и структурным атрибутом микробов, что приводит к нарушению функционирования клеточной мембраны, цитоплазмы, ферментов и белков, связанных с нормальным функционированием клетки, тем самым нарушая микробный обмен и приводят к гибели клеток (Sacchetti et. al., 2005).

Наноматериалы - хитозан, декстран, целлюлоза, крахмал, альгинат и циклодекстрин, используемые также в качестве оболочек проявляют антимикробные свойства за счет разрушения мембранного потенциала и изменение метаболического процесса (Vuuren et. al., 2010).

Небольшой размер нанокапсулированных эфирных масел увеличивает площадь поверхности на единицу объема; следовательно, они более эффективно взаимодействуют с клеткой, вызывая гибель клеток при оптимальных дозах (Jamil et. al., 2016).

Эфирные масла могут действовать в синергизме с оболочкой, обладающей противомикробной активностью, тем самым усиливая антимикробную активность нанокапсулированных экстрактов (Ahmad et. al., 2015).

Нанокапсулированное эфирное масло душицы критской в форме липосом содержит в своем составе такие биологически активные вещества: карвакрол, тимол, терпены. Данные нанокапсулы проявили активность в отношении ряда микроорганизмов: *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,

*Staphylococcus mutans*, *Staphylococcus viridans*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *Listeria monocytogenes* (Liolios et. al., 2009).

Масло мяты перечной в оболочке хитозана (коричной кислоты), представляющее собой наногель, сравнивали с эфирным маслом в обычной форме. В качестве тест-культуры использовали *A. flavus*. В результате нанокапсулированное масло проявляло большую антимикробная активность, в то время как обычное масло не привело к полному ингибированию (Beuki et. al., 2014).

Эфирное масло кумина (зиры) в оболочке хитозана (кофейной кислоты) в форме наногеля также проявило большую активность в отношении *A. flavus* в сравнении с стандартной формой (Zhaveh et. al., 2015).

Нанокапсулы эфирного масла лайма в оболочке хитозана проявило усиленную активность в отношении *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella dysenteriae*, *E. coli* (Sotelo-Boyas et. al., 2017).

Нанокапсулированное эфирное масло тимьяна головчатого, заключенного в оболочку додецилсульфата натрия и соевого масла продемонстрировало более высокие уровни ингибирования роста в отношении *S. aureus*, чем стандартное эфирное масло (Jemma et. al., 2017).

Эвгенол, извлеченный из эфирного масла растений в оболочке мальтодекстрина в форме наноэмульсии показывал антимикробную активность в отношении *E. coli* и *L. monocytogenes*. Кроме того, нанодисперсный эвгенол обладал хорошей растворимостью (Shah et. al., 2013).

Эфирное масло перечной мяты в форме наноэмульсии в оболочке триглицерола продемонстрировало антибактериальную активность в отношении культур *L. monocytogenes* и *S. aureus*. Кроме того, эмульсии сохраняли стабильность в течение 30 дней хранения (Liang et. al., 2012).

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали чистую культуру штамма грибов вида *C. albicans*.

В эксперименте исследовалась активность следующих растений:

Можжевельник обыкновенный (*Juniperus communis L.*);

Розмарин Лекарственный (*Rosmarinus officinalis, L.*);

Чистотел большой (*Chelidonium majus L.*);

Дикий ямс (*Dioscorea villosa L.*).

Методы исследования:

- выделение штамма *C. albicans* в чистую культуру;
- приготовление водных растворов нанокапсулированных экстрактов лекарственных растений;
- приготовление биопленок из нанокапсулированных экстрактов лекарственных растений;
- приготовление водных экстрактов из сухих лекарственных растений; приготовление водных экстрактов из свежесобранных лекарственных растений;
- приготовление ряда разведений экстрактов;
- приготовление питательных сред;
- посев на среды методом штриха и плотного газона.

### 2.2. Водные и сухие экстракты растений можжевельника, розмарина и дикого ямса.

#### 2.2.1. Водные растворы нанокапсулированных экстрактов растений можжевельника, розмарина и дикого ямса.

Для приготовления водных растворов экстрактов нанокапсулированных растений использовали сухие нанокапсулированные экстракты.

Нанокапсулированный можжевельник представляет собой сыпучий порошок от бежевого до светло-коричневого цвета. Сам экстракт можжевельника был заключен в альгинатную оболочку. Доля вещества была в трех концентрациях:

1:1 можжевельник-альгинат – 50% сухого экстракта можжевельника;

1:2 можжевельник-альгинат – 33,3% сухого экстракта можжевельника;

1:3 можжевельник-альгинат – 25% сухого экстракта можжевельника.

Подготовительным этапом к работе была подготовка лабораторной посуды и ее стерилизации. В ходе этого этапа посуда вымывалась, высушивалась. Стерилизовались иглы, пинцеты, шпатели. Пробирки плотно закрывались пробками. После чего лабораторная посуда и инструменты помещались на стерилизацию в сухожаровый шкаф (190 °С, 3 ч). Пробирки стерилизовали в автоклаве.

Для приготовления водного раствора экстракта можжевельника делали навеску нанокапсул. Сделали 3 навески: 0,03 г, 0,02 г, 0,01 г. Далее взвешенные нанокапсулы помещали в стерильные пробирки с дистиллированной водой, и перемешивали с помощью «Вортекса». В результате водный раствор с нанокапсулами 50% можжевельника приобретал гелеобразную консистенцию; 33,3 % можжевельник хорошо растворился в воде, 25% - практически не растворился, получились хлопья осадка на дне. Данные растворы приобрели желтовато-коричневатый оттенок.

Для посева культуры грибов *C. albicans* использовали среду Чапека, которую предварительно стерилизовали в автоклаве. Среду подогрели, разлили по чашкам Петри в присутствии пламени горелки. После застывания

среды культуру *C. albicans* с помощью микробиологической петли засекали методом штриха.

После посева штамма грибка брали стерильные диски из фильтровальной бумаги, смачивали в приготовленных водных растворах можжевельника и помещали на чашки Петри.

Схема опыта:

- контроль: 3 чашки, в каждую по 3 диска с дистиллированной водой;
- вариант 1: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом можжевельника в концентрации 0,03;
- вариант 2: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом можжевельника в концентрации 0,02;
- вариант 3: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом можжевельника в концентрации 0,01.

Далее поместили чашки в термостат на 37 °С.

Визуальный осмотр колоний, фотографирование полученных результатов проводили через 24 и 48 часов. Далее проводили исследования нанокapsулированным розмарином. Розмарин, использованный в экспериментах, был представлен в 3 оболочках: в альгинате, каррагинане и камеди. Нанокapsулы розмарина представляли собой сухой, белый, сыпучий порошок.

Для приготовления экстрактов делали навески каждого вещества по 0,03 г и 0,01 г. Всего получилось 6 навесок. Далее навески помещали в стерильные пробирки с дистиллированной водой и перемешивали с помощью «Вортекса». Полученные растворы приобретали слегка мутноватый оттенок.

После приготовления растворов разливали изначально подготовленную, разогретую среду Чапека по чашкам Петри. После застывания среды микробиологической петлей засекали штамм грибка *C.*

*albicans* методом плотного штриха. Далее стерильные диски из фильтровальной бумаги, смачивали их растворами нанокapsулированного розмарина и помещали на приготовленные чашки с культурой. Чашки помещали в термостат при температуре 37 ° C.

Визуальный осмотр колоний, фотографирование полученных результатов проводили через 24 и 48 часов.

Схема опыта:

- контроль - 3 чашки, в каждую по 3 диска с дистиллированной водой;
- вариант - 1: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом розмарина в альгинате в концентрации 0,03;
- вариант - 3: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом розмарина в альгинате в концентрации 0,01;
- вариант - 4: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом розмарина в каррагинане в концентрации 0,03;
- вариант - 5: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом розмарина в каррагинане в концентрации 0,01;
- вариант - 6: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом розмарина в камеди в концентрации 0,03;
- вариант - 7: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом розмарина в камеди в концентрации 0,01.

Всего 24 чашки по 3 диска в каждой.

Нанокapsулированный дикий ямс, также как и розмарин, представляет собой белый сыпучий порошок. Опыты с экстрактами дикого ямса проводили по аналогичной схеме.

Брали навески сухих нанокapsул по 0,05 и 0,1 грамму. Нанокapsулы дикого ямса были окружены альгинатной оболочкой. Взвешенные навески растворяли в стерильной дистиллированной воде в пробирках с помощью «Вортекса».

Далее в стерильные чашки Петри разливали среду Чапека. После застывания среды с помощью петли наносили культуру грибов методом штриха и сверху закладывали диски, смоченные водными растворами нанокapsулированного дикого ямса.

Нанокapsулированный дикий ямс был в 2 концентрациях: 50 и 33,3 % соответственно.

Схема опыта:

- контроль - 3 чашки, в каждую по 3 диска с дистиллированной водой;
- вариант - 1: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом 50% дикого ямса в альгинате в концентрации 0,005;
- вариант - 3: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом 50% дикого ямса в альгинате в концентрации 0,01;
- вариант - 4: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом 25% дикого ямса в альгинате в концентрации 0,005;
- вариант - 5: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом 25% дикого ямса в альгинате в концентрации 0,01.

### 2.2.2. Методика приготовления биопленок, и применение

Также нами были поставлены эксперименты по влиянию пленок из взятых нами нанокapsулированных экстрактов.

Для приготовления биопленок из лекарственных растений необходим сухой нанокapsулированный экстракт растения в альгинате, каррагинане или камеди. Мы использовали нанокapsулированные препараты в альгинате.

Приготовление биопленок из нанокapsулированного розмарина проводили в трех концентрациях:

- 1:1 розмарин –альгинат, то есть 50 % розмарина;
- 1:2 розмарин- альгинат, то есть 33,3 % розмарина;

1:3 розмарин- альгинат, то есть 25 % розмарина.

Для приготовления биопленки из розмарина потребовалось сырья:

1:1 – 0,635 г;

1:2 – 0,612 г;

1:3 – 0,716 г.

Приготовление биопленки

На нижнюю часть чашки Петри надевали упаковочный пакет с замком, так, что получалась небольшая емкость внутри пакета. Сверху на пакет наливали дистиллированную воду, затем по частям высыпали сухое вещество, и растворяли с помощью стерильного шприца. После полного растворения вещества образовывалась густая желеобразная масса. Полученное вещество ставили в термостат на 37 ° С для высушивания. Проверяли каждые 12 часов. В результате полное высушивание препарата происходило через 36 часов (рис.2.). Затем образовавшуюся биопленку резали стерильными ножницами на равные диски.

Таким же образом приготавливали биопленки из можжевельника. Для приготовления биопленок из можжевельника у нас потребовалось:

1:1 – 0,486 г сырья;

1:2 – 0,339 г сырья;

1:3 – 0,386 г сырья.



Рис.2. Биопленка из можжевельника

Приготовленные диски из биопленки раскладывали на чашки Петри, засеянные культурой гриба *C. albicans*. Чашки ставили в термостат на 37 ° С. Результаты фиксировали через 24 и 48 часов.

### 2.2.3. Водные экстракты свежего сырья можжевельника, чистотела, розмарина.

Для исследования проявления активности экстрактов растений на штамм *C. albicans* использовали нативные, свежесобранные растения, взятые из Ботанического сада НИУ БелГУ.

Для приготовления водных экстрактов можжевельника и чистотела сырье предварительно взвешивали. Получили навески по 10 грамм каждого. Далее сырье растирали в ступе, до выделения сока. Затем приготовленную массу заливали 100 мл предварительно подготовленной дистиллированной воды. Выдерживали соотношение 1 г сырья к 10 мл воды. После приготовления растворы плотно закрывали фольгой и ставили на 24 часа в холодильник (рис.3.).



Рис.3. Водные экстракты розмарина и чистотела

Далее приготовленные водные экстракты отфильтровывали и разводили в дистиллированной воде. В итоге получалось 4 концентрации для каждого экстракта – 100%;50%;33,3 %;25% (рис.4.).



Рис.4. Концентрированные водные экстракты можжевельника и чистотела.

Для проведения эксперимента предварительно подготавливали суточную культуру штамма *C. albicans* на среде Сабуро.

Для посева грибов на чашки Петри готовили суспензию микроорганизмов. Для этого в колбу с стерильным физиологическим раствором добавляли несколько колоний грибов и хорошо перемешивали. Полученную суспензию делали по стандарту мутности.

Далее разливали среду Сабуро на чашки Петри. После застывания среды с помощью механической пипетки добавляли суспензию грибов на чашки, и распределяли плотным газоном с помощью микробиологического шпателя по всему периметру чашки. После посева микромицетов смачивали стерильные диски в полученных водных экстрактах можжевельника и чистотела.

Схема опыта:

- контроль: 3 чашки, в каждую по 3 диска со спиртом;

- вариант 1: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом можжевельника в концентрации 100 %;
- вариант 2: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом можжевельника в концентрации 50 %;
- вариант 3: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом можжевельника в концентрации 33,3 %;
- вариант 4: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом можжевельника в концентрации 25 %;
- вариант 5: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом чистотела в концентрации 100 %;
- вариант 6: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом чистотела в концентрации 50 %;
- вариант 7: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом чистотела в концентрации 33,3 %;
- вариант 8: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом чистотела в концентрации 25 %.

Затем помещали чашки в термостат на 37 ° С. Результаты фиксировали через 24 и 48 часов.

Для приготовления водного экстракта розмарина использовали свежее нативное сырье (рис.5).



Рис. 5. Свежее нативное сырье розмарина

Предварительно сделали навеску 10 грамм, поместили в ступу и с помощью пестика растирали. Затем полученную массу заливали 100 мл дистиллированной воды и помещали в стерильную колбу. Полученную смесь нагревали и доводили до кипения. Полученный водный экстракт остужали до комнатной температуры, после чего делали серию разведений (рис.5).

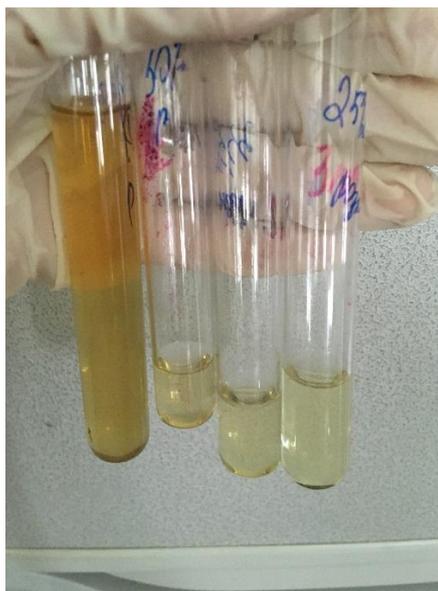


Рис. 6. Серия разведений нативного водного экстракта розмарина

После всех приготовлений разливали среду Сабуро по чашкам Петри, засеивали чистый штамм *C. albicans* с помощью механической пипетки и шпателя плотным газоном. Далее помещали стерильные диски в приготовленные экстракты и раскладывали по чашкам для определения активности розмарина в отношении культуры грибов.

Схема опыта:

- контроль: 3 чашки , в каждую по 3 диска, смоченных стерильной дистиллированной водой;
- вариант 1: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом розмарина в концентрации 100 %;
- вариант 2: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом розмарина в концентрации 50 %;

- вариант 3: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом розмарина в концентрации 33,3 %;
- вариант 4: 3 чашки по 3 диска с водным экстрактом розмарина в концентрации 25 %;

Затем помещали чашки в термостат на 37 ° С. Результаты фиксировали через 24 и 48 часов.

### 2.3. Методы статистической обработки результатов

Объем выборки используют при минимальном, но достаточном объеме выборки. При подсчете данным методом можно получить максимально полную информацию. Объем выборки оптимизируют, чтобы получить достоверные результаты на определенном уровне доверительной вероятности.

Объем выборки используют при минимальном, но достаточном объеме выборки. При подсчете данным методом можно получить максимально полную информацию. Объем выборки оптимизируют, чтобы получить достоверные результаты на определенном уровне доверительной вероятности (Моисейченко, 1996).

Объем выборки находится по формуле:

$$n = t^2 \left( \frac{V}{\Delta} \right)^2 \quad (2.3.1)$$

t – стандартное значение критерия Стьюдента;

V – коэффициент вариации, %;

Δ – допустимая относительная погрешность, %.

Приближенное значение критерия  $t_{0.95}$  можно найти по формуле:

$$t_{0.95} = 2 + (n/v) \quad (2.3.2)$$

n – фактический объем выборки (повторность)

$\nu$  – число степеней свободы ( $\nu = n-1$ ).

Для больших выборок ( $n > 30$ ) значение критерия Стьюдента постоянно:  
 $t_{0.95} \approx 2, t_{0.99} \approx 2,6$ .

Коэффициент вариации находят по формуле:

$$V = 100(s/\bar{x}) \quad (2.3.3)$$

100 – коэффициент для перевода в проценты;

$s$  – стандартное отклонение для определенного вариационного ряда;

$\bar{x}$  – средняя арифметическая этого ряда.

Приближенное значение средней арифметической находят по формуле:

$$\bar{x} \approx (x_{\max} - x_{\min})/6 \quad (2.3.4)$$

$x_{\max}, x_{\min}$  – максимальное и минимальное значение варьирующего признака;

6 – постоянное число в данной формуле.

Приближенное значение средней арифметической находят по формуле:

$$\bar{x} \approx (x_{\max} - x_{\min})/2 \quad (2.3.5)$$

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1. Влияние растворов и пленок из сухих экстрактов розмарина и можжевельника в нативном и нанокapsулированном виде на рост *C. albicans* в культуре.

Анализ полученных данных представлен на рисунках 7 и 8 из которых видно, что нанокapsулированные водные экстракты можжевельника в концентрациях от 0,01 до 0,03 не оказывают фунгицидного влияния на культуру *C. albicans*. Кроме того, исходя из рисунков можно сделать вывод, что нанокapsулированный можжевельник наоборот, стимулирует рост грибков, так как вокруг дисков и на них рост колоний более выражен.



Рис.7. Влияние водного экстракта можжевельника на культуру *C. albicans*



Рис.8. Влияние водного экстракта можжевельника на культуру *C. albicans*

Из рисунка 9 видно, что водный экстракт нанокапсулированного розмарина не оказывал ингибирующего влияния на культуру *C. albicans*. Подобная ситуация наблюдалась и с сухими экстрактами можжевельника и розмарина. Они также не имели воздействия на микромицеты.



Рис.9. Влияние водного экстракта розмарина на культуру *C. albicans*

Из данных рисунка 10 видно, что при помещении биопленок в чашку Петри, они набирались влагой и превращались в желеобразные «подушечки». На рост грибов *C. albicans* биопленки не оказывали негативное влияние, а наоборот, отмечалось некоторое положительное воздействие (вокруг дисков биопленок культура грибов росла лучше). В случае с розмарином наблюдалась идентичная картина. Таким образом, нанокapsулированные препараты растительных экстрактов не оказывают антифунгицидного действия, а даже несколько стимулировали рост гриба *C. albicans* в культуре.



Рис.10. Влияние нанокapsулированных биопленок можжевельника на *C. albicans* в культуре

### 3.2. Влияние растворов и биопленок из экстракта дикого ямса на рост *C. albicans* в культуре.

Влияние растворов и биопленок из экстракта дикого ямса показано на рисунке 11, из которого видно, что нанокapsулированные экстракты дикого ямса в исследованных концентрациях также не оказывают выраженного фунгицидного действия на культуру *C. albicans*.



Рис.11. Влияние водного экстракта нанокapsулированного дикого ямса на культуру *C. albicans*

### 3.3. Влияние водных экстрактов розмарина, можжевельника и чистотела в нативном и нанокapsулированном виде на рост *C. albicans* в культуре.

Из рисунка 12 видно, что можжевельник оказал некоторое негативное действие на культуру грибков. Зоны подавления не большие, однако, четкие. Чем выше была концентрация, тем больше были зоны ингибирования. Величина зон составляла в среднем 0,25- 0,1 мм. В концентрации 100% наблюдалась наибольшая зона задержки роста штамма *C. Albicans*, она составила до 0,3 мм.



Рис.12. Влияние водного экстракта свежего сыра можжевельника в концентрации 100% на рост *C. albicans* в культуре

Из диаграммы видно, что водный экстракт из свежего сыра можжевельника имеет не большое фунгицидное влияние на штамм микромицетов, оно наиболее выражено в максимально взятой нами концентрации (рис. 13). Однако, с учетом статистической обработки данных достоверна разница только между максимальной концентрацией 100% и минимальной 25% экстрактов можжевельника.

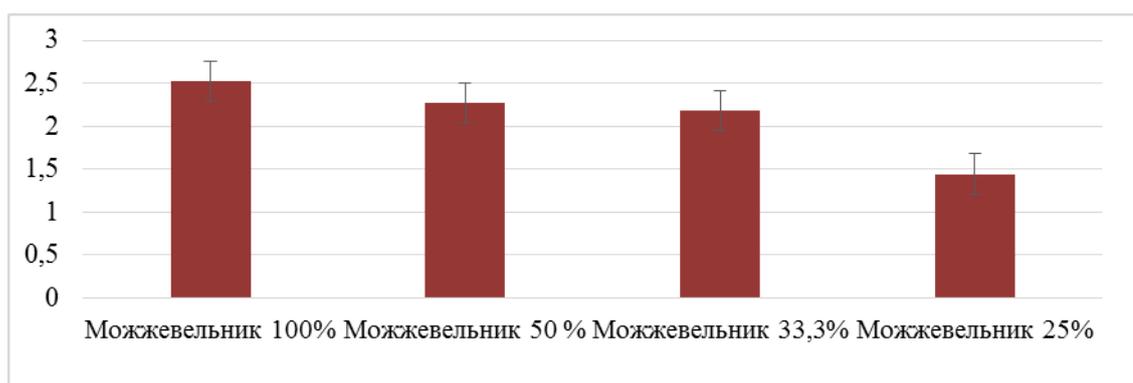


Рис.13. Влияние водных экстрактов можжевельника на рост *C. albicans* в культуре

В опыте с экстрактом чистотела наблюдалась несколько другая картина. В ходе осмотра колоний наблюдалось большее влияние на грибы 50 % и 25% растворов экстрактов чистотела (рис.14.).



Рис.14. Влияние водного экстракта свежего сырья чистотела в концентрации 50% на рост *C. albicans* в культуре

В результате статистической обработки оказалось также, что данные недостоверны между собой, то есть влияние водного экстракта чистотела на рост *C. albicans* в культуре гораздо менее выражено, чем в контроле, в качестве которого мы брали спирт. Это показывает, что зоны ингибирования разных концентраций экстракта чистотела действовали приблизительно на одном уровне. Можно сказать, что для рекомендации данного сырья в качестве решения проблемы его антимикотическое действие на условно-патогенные грибки *C. albicans* не достаточно выражено (рис.15.).

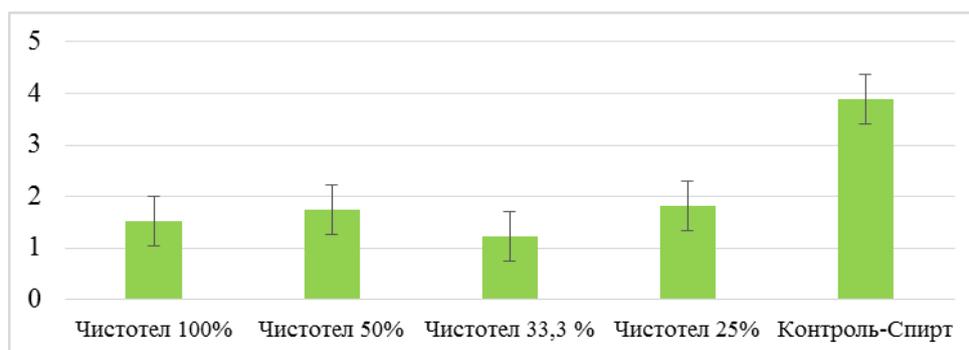


Рис. 15. Влияние водных экстрактов чистотела на рост *C. albicans* в культуре

В ходе исследовательской работы выяснилось, что нативное сырье свежего розмарина оказало меньшее влияние на культуру грибов, в сравнении с нативным можжевельником и чистотелом, однако зоны ингибирования роста составили около 0,05 - 0,15 мм. Чем выше была концентрация активного вещества, тем больше были зоны задержки роста (рис.16.).

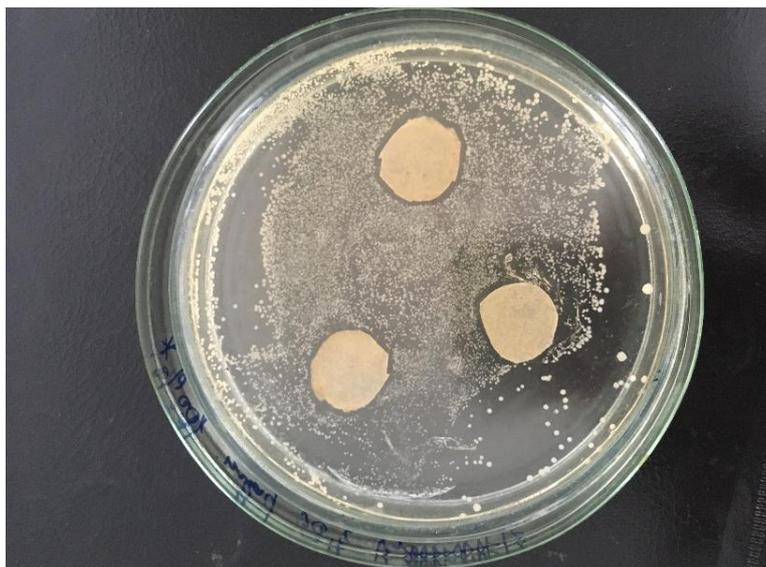


Рис.16. Влияние водного экстракта свежего сырья розмарина в концентрации 100% на рост *C. albicans* в культуре

Из данных диаграммы 17 видно, что данные являются статистически достоверными лишь в крайних максимальной и минимальной взятых нами концентрациях, значит водный экстракт розмарин проявил недостаточное влияние на культуру грибков.

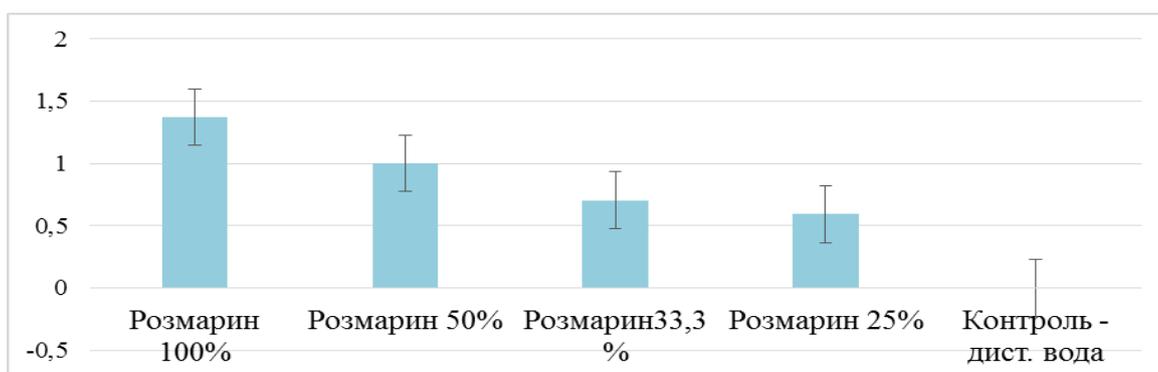


Рис.17. Влияние водных экстрактов розмарина на рост *C. albicans* в культуре

На рисунке 18 представлена общая диаграмма по влиянию водных экстрактов свежего сырья лекарственных растений. Сравнивая их между собой, видно, что можжевельник в 100% концентрации проявил наибольшую активность в отношении грибов в сравнении с чистотелом и розмарином. Аналогичная ситуация наблюдалась и в отношении 50% и 33,3 % концентрации. В случае с водными растворами 25 % активного вещества чистотела, то он проявил более выраженные зоны ингибирования.

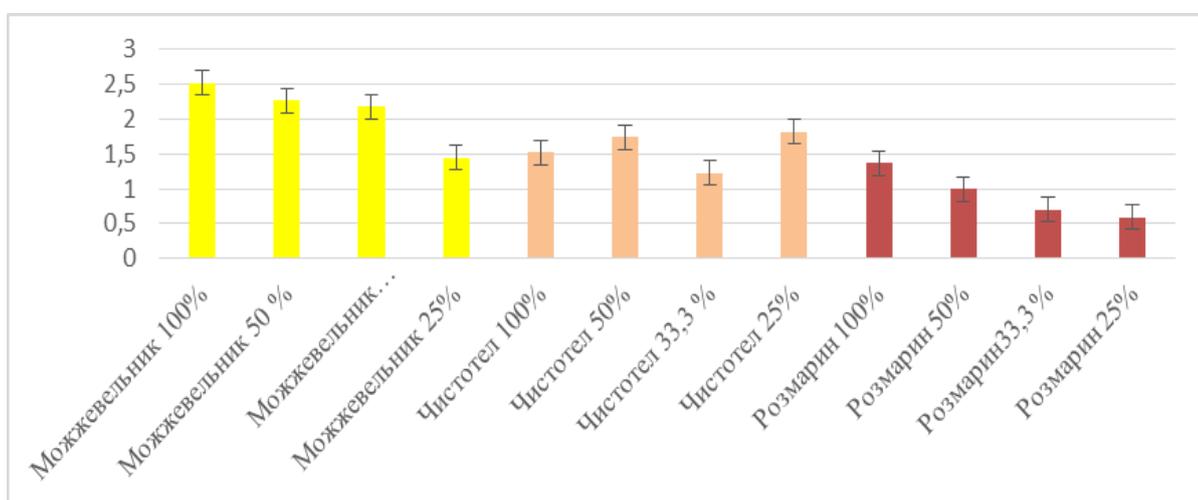


Рис.18. Влияние водных экстрактов можжевельника, чистотела и розмарина на рост *C. albicans* в культуре

На основании исходных данных, в программе Microsoft Office Excel с помощью описательной статистики (метод дисперсионного анализа) нами были вычислены следующие параметры: среднее значение, стандартная ошибка, дисперсия и стандартное отклонение.

Для обработки данных разностным методом мы использовали результаты 100% концентраций водных экстрактов лекарственных растений. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

Все данные занесены в таблицы 1 и 2.

Таблица 1. Обработка разностным методом средних значений воздействия лекарственных растений и контроля на микроорганизмы, полученных при вычислении радиуса (мм), в концентрации 100%.

Варианты		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	t <sub>фактическое</sub> (1-2)
контроль	можжевельник					
5,33	2,00	3,33	1,96	3,84	0,78	1,75
3,67	5,00	-1,33	-0,04	0,0016		
2,00	3,00	-1,00	-2,37	5,61		
6,33	2,33	4,00	2,63	6,91		
2,33	3,33	-1,00	2,37	5,61		
1,00	1,33	-0,33	-1,70	2,89		
8,33	2,67	5,66	4,29	18,40		
2,33	1,67	0,66	-0,71	0,50		
3,67	1,33	2,34	0,97	0,94		
X <sub>cp1</sub> =3,89	X <sub>cp2</sub> =2,52	d <sub>cp</sub> =1,37	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> = 44,7		
Варианты		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	t <sub>фактическое</sub> (1-2)
контроль	розмарин					
5,33	2,33	3,00	0,48	0,23	0,74	3,40
3,67	1,67	2,00	-0,52	0,27		
2,00	1,00	1,00	-1,52	2,31		
6,33	2,00	4,33	1,81	3,27		
2,33	0,67	1,66	-0,86	0,73		
1,00	1,00	0	-2,52	6,35		
8,33	1,00	7,33	4,81	23,13		
2,33	1,67	0,66	-1,86	3,45		
3,67	1,00	2,67	0,15	0,022		
X <sub>cp1</sub> =3,89	X <sub>cp2</sub> =1,37	d <sub>cp</sub> = 2,52	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> =39,76		

Варианты		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	t <sub>фактическое</sub> (1-2)
контроль	чистотел					
5,33	2,00	3,33	0,96	0,92	0,74	3,20
3,67	1,00	2,67	0,3	0,09		
2,00	1,00	1,00	-1,37	1,87		
6,33	2,00	4,33	1,96	3,84		
2,33	2,33	0	-2,37	5,61		
1,00	0,33	0,67	-1,7	2,89		
8,33	1,33	7,00	4,63	21,43		
2,33	1,67	0,66	-1,71	2,92		
3,67	2,00	1,67	-0,7	0,49		
X <sub>cp1</sub> =3,89	X <sub>cp2</sub> =1,52	d <sub>cp</sub> =2,37	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> = 40,06		

Таблица 2. Обработка разностным методом средних значений воздействий лекарственных растений на микроорганизмы (сравнение между собой), полученных при вычислении радиуса (мм), в концентрации 100%.

Варианты		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	t <sub>фактическое</sub> (1-2)
можжевельник	розмарин					
2,00	2,33	-0,33	-1,48	2,19	0,42	2,73
5,00	1,67	3,33	2,18	4,75		
3,00	1,00	2,00	0,85	0,72		
2,33	2,00	0,33	-0,82	0,67		
3,33	0,67	2,66	1,51	2,28		
1,33	1,00	0,33	-0,82	0,67		
2,67	1,00	1,67	0,52	0,27		
1,67	1,67	0	-1,15	1,32		
1,33	1,00	0,33	-0,82	0,67		
X <sub>cp1</sub> =2,52	X <sub>cp2</sub> =1,37	d <sub>cp</sub> =1,15	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> =13,54		

Варианты		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	t <sub>фактическое</sub> (1-2)
розмарин	чистотел					
2,33	2,00	0,33	0,48	0,23	0,24	0,62
1,67	1,00	0,67	0,82	0,67		
1,00	1,00	0	0,15	0,02		
2,00	2,00	0	0,15	0,02		
0,67	2,33	-1,66	1,51	2,28		
1,00	0,33	0,67	0,82	0,67		
1,00	1,33	-0,33	-0,18	0,03		
1,67	1,67	0	0,15	0,02		
1,00	2,00	-1,00	-0,85	0,72		
X <sub>cp1</sub> =1,37	X <sub>cp2</sub> =1,52	d <sub>cp</sub> = -0,15	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> = 4,66		
Варианты		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	t <sub>фактическое</sub> (1-2)
можжевельник	чистотел					
2,00	2,00	0	-1,00	1,00	0,45	2,22
5,00	1,00	4,00	3,00	9,00		
3,00	1,00	2,00	1,00	1,00		
2,33	2,00	0,33	-0,67	0,44		
3,33	2,33	1,00	0	0		
1,33	0,33	1,00	0	0		
2,67	1,33	1,34	0,34	0,11		
1,67	1,67	0	-1,00	1,00		
1,33	2,00	-0,67	-1,67	2,78		
X <sub>cp1</sub> =2,52	X <sub>cp1</sub> =1,52	d <sub>cp</sub> =1,00	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> = 15,33		

Проанализировав полученные данные таблицы 1, и пользуясь правилом: если  $t_{\phi} \geq t_{\tau}$ , можно с уверенностью сказать, что при уровне вероятности  $P_{0,95}$  и степени свободы 16, разность между вариантами

контроль-розмарин и контроль-чистотел существенна, тогда как разница выборок в случае сравнения контроля и можжевельника – не существенна.

В сравнительном анализе таблицы 2 при уровне вероятности  $P_{0,95}$  и степени свободы 16, видно, что разница между вариантами можжевельник-розмарин и можжевельник-чистотел существенна, тогда как разница в выборках розмарин-чистотел не существенна.

## ВЫВОДЫ

В результате проведенной исследовательской работы было установлено, что нанокапсулированные водные экстракты можжевельника и розмарина не имели фунгицидного воздействия на *C. albicans* в культуре, следовательно, не могут рекомендоваться в качестве альтернативы противогрибковым препаратам. Механизм действия нанокапсулы позволяет постепенно высвобождать небольшие дозы вещества, которые оказались не достаточными для подавления роста грибка *C. albicans*. Напротив, такие малые концентрации часто стимулировали рост грибка, что наблюдалось нами в виде плотного обрастания краев дисков и частично их поверхности.

Также было определено влияние водных экстрактов розмарина, можжевельника и чистотела на рост *C. albicans* в культуре. Установлено, что данные экстракты растений в не большой степени подавляют культуру микромицетов, однако с учетом статистической обработки эти данные являются, достоверны лишь в крайних концентрациях.

Кроме того, было оценено влияние растворов и пленок из сухих экстрактов дикого ямса в нативном и нанокапсулированном виде на рост *C. albicans* в культуре. В нашем опыте данное растение не оказало выраженного фунгицидного влияния на рост грибков.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бирюков И.В., Лаптев Ю.В. Воздействие некоторых лекарственных растений на патогенную микрофлору // Аграрная наука – сельскому хозяйству. Сборник статей. – 2017. – С. 246-248.
2. Бухарин О.В., Челпаченко О.Е., Перунова Н.Б и др. Экспериментально-клиническое обоснование выбора антимикотических фитопрепаратов // Вестник Оренбургского государственного университета. – №3. – 2015. – С. 183-191.
3. Быкова Л.П., Седельникова О.А., Корначева Ю.В. и др. Противогрибковая активность некоторых эфирных масел // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Том 13. – №2. – С.66-67.
4. Вальшев А.В., Перунова Н.Б., Вальшева И.В. и др. Факторы персистенции дрожжеподобных грибов рода *Candida* // Успехи медицинской микологии: материалы первого всероссийского конгресса по медицинской микологии. М. – Том 1. – 2003. – С.53.
5. Годовалов А.П., Быкова Л.П. Антимикробная активность производных некоторых растений // Современные научные исследования и разработки. – №1. – 2017. – С. 58-61.
6. Ермакова Т.С., Титов Л.П. Антимикотическое действие эфирных масел на дрожжеподобные и плесневые грибы // Успехи медицинской микологии. – №1. – 2003. – С. 95-96.
7. Зорин Е.Б., Сорокина А.А. Изучение эфирного масла розмарина лекарственного // Фармацевтическая химия и фармакогнозия. – № 6. – 2007. – С. 14-16.
8. Ибрагимова А.З., Ловцова Л.Б., Степанова А.П. и др. Исследование подавляющего действия эфирных масел на различные микроорганизмы // Вестник всероссийского научно-исследовательского института жиров. – №1. – 2010. – С. 27-29.

9. Карпунина Т.И., Трухина Е.В. Морфометрический анализ в оценке биологических свойств *C. albicans* при различных формах вагинального кандидоза // Вестник новых медицинских технологий. – № 2. – 2005. – С. 16-18.
10. Кашкин П.Н., Лисин В.В. Практическое руководство по медицинской микологии. – Л.: Медицина. – 1983. – 192 с.
11. Капустина О.А., Карташова О.Л. Факторы патогенности грибов рода *Candida* и возможность их регуляции эфирными маслами // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). – №1. – 2013. – С. 1-10.
12. Кролевец А.А., Тырсин Ю.А., Быковская Е.Е. Применение нано и микрокапсулирования в фармацевтике и пищевой промышленности часть 2. Характеристика инкапсулирования // Вестник российской академии наук. – №1 – 2013. – С. 77-84.
13. Куликов С.Н., Шакирова Д.Р., Тихонов В.Е., и др. Антимикотическая активность хитозана и его производных в отношении *Candida albicans* // Проблемы медицинской микологии. – №4 – 2012. – С. 50-54.
14. Куркин В.А., Артамонова Е.С. Определение флавоноидов в траве чистотела большого // Фармацевтическая химия и фармакогнозия. – №5. – 2007. – С. 10-12.
15. Лисовская С.А., Глушко Н.И., Халдеева Е.В. Влияние условий культивирования на адгезивную способность *Candida albicans* // Успехи медицинской микологии. – Том 9. – 2007. – С. 6-8.
16. Мозговая Е.В., Талалаева Н.Е., Маругина Е.А., и др. Антимикотическая терапия кандидозного вульвовагинита у беременных // Гинекология Эндокринология. – №8(96). – 2014. – С. 57-63.
17. Моисейченко В.Ф., Трифонова М.Ф., Заверюха А.Х. и др. Основы научных исследований в агрономии. – Колос. –1996. – 336 с.

18. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия: Учебник. – 4-е изд. перераб. и доп. – М.: Медицина. – 2002. – 656 с.
19. Николенко М.В. Суточная динамика фосфолипазной активности *Candida albicans* // Проблемы медицинской микологии. – №2. – 2010. – С.49-52.
20. Перунова Н.Б. Модифицирующее влияние эфирных масел растений на биологические свойства *Candida albicans* // Проблемы медицинской микологии. – Том 8. – №2. – 2006. – С. 75.
21. Погоцкая А.А., Бузук Г.Н., Созинов О.В. Морфометрия *Chelidonium Majus L.*: взаимосвязь размеров, формы листа и содержания алкалоидов и фенольных соединений // Вестник фармации. – № 3. – 2010. – С. 26-39.
22. Полухина Т.С., Котова В.Ю., Шири Юсри Определение суммы органических кислот в розмарине лекарственном (*Rosmarinus Officinalis L.*), произрастающем на территории Туниса // Сборник материалов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации. – 2016. – С. 500-504.
23. Рамазанова Б.А., Батырбаева Д.Ж., Бекболатова К.А., и др. Антилизозимная активность грибов рода *Candida* как один из факторов патогенности // Успехи современной микологии. – №11. – 2013. – С.52-54.
24. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции // Руководство для врачей. 2 изд.- М.: Издательство БИНОМ. – 2008. – 480 с.
25. Скоробогатова Р. А., Жебрак И. С., Сайко О. В. и др. Влияние водных настоев растений на дрожжевые грибы // Новые антимикотики и перспективные фунгициды. – № 1. – 2010. – С. 216-235.
26. Соковнина С.В., Танчева А.А., Ильина А.А. Антимикотическая активность эфирных масел // Вестник науки и образования. – №11(35). – 2017. – С. 109-111.

27. Струкова Е.Г., Ефремов А.А., Гонтова А.А. и др. Воздействие эфирных масел сибирского региона на условно-патогенные микроорганизмы // Химия растительного сырья. – №4. – 2009. – С. 79-82.

28. Тохсырова З.М., Никитина А.С., Попова О.И. Аминокислоты побегов розмарина лекарственного (*Rosmarinus Officinalis L.*), интродуцированного в ботаническом саду пятигорского медико-фармацевтического института // Фармацевтические науки. – № 2. – 2015. – С. 3330-3332.

29. Тохсырова З.М., Никитина А.С., Попова О.И. Изучение антимикробного действия эфирного масла из побегов розмарина лекарственного (*Rosmarinus Officinalis L., Lamiaceae*) лекарственного // Фармация и фармакология. – № 1(14). – 2016. – С. 66-71.

30. Уткина Т.М., Потехина Л.П. Влияние растительных экстрактов хвойных растений на персистентные свойства *Candida albicans* // научно-практическая конференция по медицинской микологии. – № 2. – 2014. – С. 110-154.

31. Фролова А.В. Эфирные масла – перспективные источники при разработке антимикробных лекарственных средств для местного лечения гнойных ран // Вестник ВГМУ. – №1. – 2010. – С. 1-10.

32. Фролова А.В., Косинец А.Н., Бузук Г.Н. Сравнительный анализ антимикробной активности лекарственных растений // Вестник фармации. – №4 (34). – 2006. – С. 54-61.

33. Чарушина И.П., Фельдблум И.В., Воробьева Н.Н., и др. Инвазивный кандидоз у ВИЧ-инфицированных пациентов // Федеральные клинические рекомендации. – Москва. – 2017 – 46 с.

34. Челпаченко О.Е., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. и др. Микробиологические аспекты антимикотической фитотерапии (обзор) // Проблемы медицинской микологии. – №3. – 2014. – С. 13-19.

35. Шакалите Ю., Пашкявичюс А., Ложене К. Действие натуральных фунгицидных средств на рост видов дрожжеподобных грибов *Candida* // Материалы второго съезда микологов России. Современная микология в России. Том 2. М.: Национальная академия микологии. – 2008. – С.305-306.
36. Швядене Ю., Пашкявичюс А., Швядас А. Чувствительность дрожжей рода *Candida* к эфирным маслам // Успехи медицинской микологии. Том 12. Издательство: Общероссийская общественная организация "Общественная национальная академия микологии" (Москва). – 2014. – С. 436- 438.
37. Abdullah Ijaz Hussain<sup>1</sup>, Farooq Anwar, Shahzad Ali Shahid Chathal *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities // Brazilian Journal of Microbiology. – № 41. – 2010. – P. 1070-1078.
38. Acevedo-Fani, Salvia-Trujillo, Rojas-Grau et. al. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties // Food Hydrocolloid. – № 47. –2015. – P. 168-177.
39. Ahmad A. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates // J. Med. Microbiol. – Vol. 59. – 2010. – P. 1178-1184.
40. Al-Haj N.A., Shamsudin M.N., Alipiah et. al. Characterization of *Nigella sativa* L. essential oil-loaded solid lipid nanoparticles // American Journal of Pharmacology and Toxicology. – №5. – 2010. – P.52-57.
41. Alvarez-Paino M., Munoz-Bonilla A., Fernandez-Garcia M. Antimicrobial polymers in the nano-world // Nanomaterials. – №7. – 2017. – P. 1-44.
42. Almadiy A. A., Nenaah G. E., Al Assiuty et. al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and major fractions of four *Achillea* species and their nanoemulsions against foodborne bacteria // Food Science and Technology. – №69. – 2016. – P. 529-537.

43. Atrooz O. M. Effects of alkylresorcinolic lipids obtained from acetonic extract of Jordanian wheat grains on liposome properties // *International Journal of Biological Chemistry*. – №5. – 2011. – P. 314-321.
44. Beyki M., Zhavah S., Khalili et. al. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus* // *Industrial Crops and Products*. – №54. – 2014. – P. 310-319.
45. Bozzuto G., Molinari A. Liposomes as nanomedical devices // *International Journal of Nanomedicine*. – №10. – 2015. – P. 975-999.
46. Bruce C.C., Kathleen L.C., Jong H.K. Chemosensitization as a means to augment commercial antifungal agents // *Front. Microbiol.* – №7 9. – 2012. – P.1-20.
47. Bucar F., Wube A., Schmid M. Natural product isolation–how to get from biological material to pure compounds // *Natural Product Reports*. – №30. – 2013. – P. 525-545.
48. Calo J. R., Crandall P. G., O'Bryan et. al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review // *Food Control*. – №54. – 2015. – P. 111-119.
49. Chang Y., McLandsborough L., McClements D. J. Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: influence of ripening inhibitors // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – №60. – 2012. – P. 12056-12063.
50. Donsi F., Annunziata M., Sessa M. et. al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods // *LWT-Food Science and Technology*. – №44. – 2011. – P. 1908-1914.
51. Donsi F., Cuomo A., Marchese E., et. al. Infusion of essential oils for food stabilization: Unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity // *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. – №22. – 2014. – P. 212-220.

52. Espina L., Somolinos M., Loran S., et. al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes // *Food Control*. – №22. – 2011. – P. 896-902.
53. Gomes C., Moreira R. G., Castell-Perez E. Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications // *Journal of Food Science*. – №76. – 2011. – P.16-24.
54. Hemaiswarya S., Krutiventi A.K., Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases // *Phytomedicine*. – Vol. 15. – 2008. – P. 639-652.
55. Hosseini S. F., Zandi M., Rezaei M. et. al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study // *Carbohydrate Polymers*. – № 95. – 2013. – P. 50-56.
56. Jamil B., Abbasi R., Abbasi S. et. al. Encapsulation of *Cardamom* Essential Oil in chitosan nano-composites: In-vitro efficacy on antibiotic-resistant bacterial pathogens and cytotoxicity studies // *Frontiers in Microbiology*. – № 7. – 2016. – P. 1-10.
57. Jemaa M. B., Falleh H., Serairi R. et. al. Nanoencapsulated *Thymus capitatus* essential oil as natural preservative // *Food Science & Emerging Technologies*. – 2017. – P. 1-21.
58. Kavanaugh N. L., Ribbeck, K. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas spp.* and *Staphylococcus aureus* biofilms // *Applied and Environmental Microbiology*. – № 78. – 2012. – P. 4057-4061.
59. Kujur A., Kiran S., Dubey N. K., Prakash B. Microencapsulation of *Gaultheria procumbens* essential oil using chitosan-cinnamic acid microgel: Improvement of antimicrobial activity, stability and mode of action // *LWT-Food Science and Technology*. – № 86. – 2017. – P. 132-138.

60. Langford M.L. et al. Activity and toxicity of farnesol towards *Candida albicans* are dependent on growth conditions // Antimicrob. Agents Chemother. – Vol. 54. – 2010. – P. 940-942.
61. Liang R., Xu S., Shoemaker, C. F., Li Y., Zhong, F., Huang, Q. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – № 60. – 2012. – P. 7548-7555.
62. Mahboubi M.M., Ghazian B.F. In vitro synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans* // Phytomedicine. – Vol. 17. – 2010. — P. 771-774.
63. Liolios C. C., Gortzi O., Lalas S. et. al. (Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity // Food Chemistry. – № 112(1). – 2009. – P. 77-83.
64. Prabuseenivasan S., Jayakumar M., Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils // BMC Complem. and Altern. Med. – № 39. – 2006. – P. 1-8.
65. Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., et. al. Assessment of chemically characterised *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its major compounds as plant-based preservative in food system based on their efficacy against food-borne moulds and aflatoxin secretion and as antioxidant // International Journal of Food Science & Technology. – № 50. – 2015. – P. 1792-1798.
66. Rao A. et al. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway // Antimicrob. Agents Chemother. – Vol. 54. – 2010. – P. 5062-5069.
67. Rattanachaikunsopon P., Phumkhachorn P. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food // Journal of Bioscience and Bioengineering. – № 110. – 2010. – P. 614-619.

68. Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M et. al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods // *Food Chemistry*. – № 91. – 2005. – P. 621-632.
69. Shah B., Davidson P. M., Zhong Q. Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in bovine milk // *International Journal of Food Microbiology*. – № 16191. – 2013. – P. 53-59.
70. Shidhaye S. S., Vaidya R., Sutar S., et. al. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers-innovative generations of solid lipid carriers // *Current Drug Delivery*. – № 5. – 2008. – P. 324-331.
71. Shirtliff M.E. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – Vol. 53. – 2009. – P. 2392-2401.
72. Sotelo-Boyas M. E., Correa-Pacheco Z. N., Bautista-Banos S., Corona-Rangel, M. L. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens // *LWT-Food Science and Technology*. – № 77. – 2017. – P. 15-20.
73. Stepan Pepeljnjaki, Ivan Kosalec, Zdenka Kalo, Era Nikola Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis L., Cupressaceae*) // *Acta Pharm.* – № 55. – 2005. P. –417–422.
74. Valencia-Sullca, C., Jimenez, M., Jimenez, A., Atares, L., Vargas, M., Chiralt, A. Influence of liposome encapsulated essential oils on properties of chitosan films // *Polymer International*. – № 65. – 2016. – P. 979-987.
75. Van Vuuren, S. F., du Toit, L. C., Parry, A., Pillay, V., Choonara, Y. E. Encapsulation of essential oils within a polymeric liposomal formulation for enhancement of antimicrobial efficacy // *Natural Product Communications*. – № 5. – 2010. – P. 1401-1408.
76. Yang Jiang, Nan Wu, Yu-Jie Fu, Wei Wang, Meng Luo, Chun-Jian Zhao, Yuan-Gang Zu, Xiao-Lei Liu Chemical composition and antimicrobial

activity of the essential oil of Rosemary // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – №32. – 2011. – P. 63-68.

77. Yu L.H. Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm // *Antimicrob. Agents Chemother.* – Vol. 56. – 2012. – P.7 70-775.

78. Zhaveh, S., Mohsenifar, A., Beiki, M., Khalili, S. T., Abdollahi, A., Rahmani-Cherati, T., Tabatabaei, M. Encapsulation of *Cuminum cyminum* essential oils in chitosan- caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus* // *Industrial Crops and Products*. – № 69. – 2015. – P. 251-256.

79. Xu I. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli* // *Lett. Appl. Microbiol.* – Vol. 47. – 2008. – P. 174-179.

80. Zore G.B. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle // *Phytomedicine*. – Vol. 18. – 2011. – P. 1181-1190.